

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**NLRP6: UN COMPONENTE  
NEFROPROTECTOR DEL INFLAMASOMA**

**TESIS DOCTORAL**

Lara Valiño Rivas

Madrid, 2019

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



Tesis doctoral presentada por **Lara Valiño Rivas,**

Graduada en Biotecnología  
Máster en Fisiopatología y Farmacología Celular y Molecular

Trabajo dirigido por el **Dr. Alberto Ortiz Arduán** y la **Dra. María Dolores Sánchez Niño** y llevado a cabo en el laboratorio de nefrología experimental y patología vascular del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz

Madrid, 2019

*Ós meus*

“La única gente que me interesa es la que está loca, la gente que está **loca por vivir**, loca por hablar, loca por salvarse, con ganas de todo al mismo tiempo, la gente que nunca bosteza ni habla de lugares comunes, sino que arde, arde como fabulosos cohetes amarillos explotando igual que arañas entre las estrellas.” *J.Kerouac*

Toda tesis comienza...

Me gustaría empezar diciendo que toda tesis comienza con un viaje. El mío comenzó a más de 600 km el año 2009, cuando la A52 me llevó rumbo a Salamanca y años después enlazó con la A6 para llevarme a Madrid. Como si se tratase de una historia de Jack Kerouac, en este “camino” he conocido a mucha gente que me ha aportado una gran cantidad de historias que sin duda me llevaré siempre en la maleta de la memoria...

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis. Gracias al Dr. Alberto Ortiz por dejarme formar parte de este grupo. Muchas gracias por tu increíble conocimiento, por tener respuestas para todo, por formarme y por dejarme aprender de ti, pero sobre todo, por tener siempre unas palabras amables para todo ello. A mi directora la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Sánchez Niño, a Loli. Gracias por todos estos años, por crear esta tesis que tanto nos ha costado y cuyo comienzo no fue sencillo. Gracias por dejarme evolucionar de aquella “niñilla”, como tu decías, que un octubre recogiste en las puertas giratorias de la FJD a la persona que hoy soy, mucho más fuerte y muy orgullosa de lo que hemos construido.

Pero una tesis no sólo son las personas que la ejecutan, sino las personas que la rodean y de absolutamente todos he aprendido algo. Gracias Adrián por ser un gran descubrimiento, por todas esas conversaciones a través del ordenador y nuestras charlas científicas (y no tanto). Gracias Gina, por ser la SONRISA del laboratorio, por esa calma y esa paz que transmites, eres increíble. Gracias Julito, por ese salero, por esos cánticos en la campana, por llenar el laboratorio de un color especial. Muchas gracias también a Su, por echarme una mano con mis despistes y mis IHQs, a Ana y a Diego. Muchas gracias a todos los compañeros que he tenido estos años y por todo lo que me habéis ayudado. Muchas gracias a Laura con la que he compartido una gran parte de esta tesis, a Nuria, a Rocío. A la gente que ha venido de estancia a Abril, a Paulo. A los TFG y TFM que han tenido que aguantarme, a Álvaro, que es un auténtico encanto, a mi Mr MageD2 Mateo, que te recuerdo con mucho cariño y te deseo todo lo mejor. A Yolanda, malamente FRA, FRA. A Diego Ayuso, porque pese a que hayas sido un pesado de la mesa de atrás, en el fondo se te echa de menos. Al Dr. Ciro Baeza, que pese a ser el más pesimista al fin hizo una tesis maravillosa y estamos muy orgullosos de él. A mi nueva compañera, Zaza, a la que le esperan unos años fantásticos aquí con nosotras! Pero sobre todo, a una persona cuyos meses aquí me hicieron muy feliz. Muchas gracias Jemima, mi J, “my sweetie”, por toda la luz que desprendes, por ser la mejor “guiri” que hayamos podido tener, porque en mi corazón siempre <<habrá un trocito más de pizza, por favor!!>>. See you soonish.

También quería dar las gracias a todos los nefrólogos que me han ayudado siempre y en especial a ti Bea, por ser alguien lleno de vida, siempre sonriendo y a la que ha sido un placer conocer. También quería dar las gracias a los residentes con los que he compartido ratitos en el laboratorio como Esme, Sole, Teresa, Sol...

Por supuesto, mi alma viajera siempre ha hecho que tenga una segunda casa y ahí me encuentro con mi segundo laboratorio, el hogar de la Dra. Marta Ruíz Ortega.



Muchas gracias por acogerme como una más y tratarme siempre tan bien. Por supuesto, en un buen hogar encontramos a unas buenas personas. Muchas gracias a Raúl por ayudarme y “vacilarme”, por crear el término “hacer un Lara” y hacerme poner roja en décimas de segundo. Muchas gracias por iniciarme en el club del desayuno en 2014, pero, sobre todo, por ser un buen compañero, amigo y por ser una buenísima persona. Muchas gracias a tu hermanísima Raquel porque aunque ya no esté en la FJD, es como si nunca se hubiera ido y espero poder verte muy pronto por aquí. Muchas gracias por tu ayuda y consejos. Muchas gracias también a Laura Santos, por ser la dulzura, por tener el mejor carácter del mundo, por ser una personita simplemente adorable. A Antonio, una de las recientes incorporaciones que ya se ha acuñado el término de hermano, supongo que será por nuestra tez cubana. A Elena, porque te espera un gran año y espero que lo vivas con muchísima alegría. A Albertito, por recordarme y subirme el ánimo con mi “pelazo”. También a Rosario, a Ester y a Sebas, a Lucía y a Javi. A Luquitas “Cachai” porque esperábamos con ansia tu vuelta para carretear de nuevo, un 8 y medio nos espera máquina!

Como no, darle las gracias a mi Elsa, a Laura Márquez. Ya te lo he dicho muchas veces, pero gracias por no decepcionarme nunca, por ser transparente, por ser bonita por dentro y fuera, por ser de lo mejor que me llevo de aquí.

Siguiendo el pasillo, después del cuarto frío, quería dar las gracias a los Luíses como os llamaba cuando no os conocía. Muchas gracias a Pili y a Mili, a Luís y a Jose Luís, por todo lo que me he reído con vosotros estos años. Me sigue faltando alguien detrás. Por supuesto, muchas gracias a vuestra gente. A dieguito piscinas, que todavía seguimos esperando esa visita a la piscina famosa. A Nere, ese espíritu aventurero, te deseo lo mejor en esta etapa tan increíble que empieza con Julia. También a Carmencita malísima, por tener la risa más contagiosa de la FJD. Por supuesto a ti RAKA, porque sólo tú puedes entrar gritando al laboratorio y no querer matarte, porque Vance Joy sea el primero de muchos y en especial a ti Patri, por ser un gran apoyo todo este tiempo. Por todo lo que te has preocupado de mí y ayudado, por todas nuestras conversaciones increíbles y por todas las que nos quedan! Eres una gran persona! A Carmen G, por su ayuda y a sus niñas, tanto las que están como las que ya no. A Laura López, Miss scape room, ánimo con esta etapa final. Al equipo coffee a Su y a Luna, por esos ratitos graciosos en la cafetería con vecinos incluidos. También a Ana. A las nuevas incorporaciones Gema y Nacho, los cuales prometen bastante para incluirlos en el club salidas nocturnas y otras charlas filosóficas.

A Juan Moreno, por esos bailes que recuerdo a mi llegada y los chistacos. A Mel, muchas gracias por aquel viaje a París, suerte en Córdoba! A Carmen y a su Vicentito, a las Crises G y V, suerte en vuestras tesis! También a Estrella.

Como no, aquellos que ya no estáis. A Kike, a Mr Bisfenol! por todos esos chistes y momentitos espagnolos. A mi Morgui, a mi calvo favorito, porque eres pura bondad y sabes que siempre has sido de mis personas favoritas aquí, aunque me confunda de portal. También a Sandra. A Alfon y a Cernes, la pareja perfecta. Eráis puro buen rollo en el laboratorio, que seguro que habréis creado allí donde ahora estáis (con vuestro reggae árbol-andamio incluido). A Belén, de las primeras personas que conocí aquí por

tus palabras amables. A lol, Elena, Valva y Aino, se os echa de menos. A mi Cristianciqui, por ser un ser maravilloso, por ser no sólo increíblemente listo, sino por ser tan buen compañero que cuesta decirlo. Espero que nos veamos muy muy pronto. Por supuesto a mis Olghas. A mi Olha Z. y a mi Olga R. por toda nuestra vida, por suerte, fuera de aquí, por nuestras cenas, meriendas, conciertos de Radio 3 y tardes de picnic. Porque he tenido la suerte de conocerlos y de descubrirlos, por ser amigas que, sin duda, son para siempre. A mi tercera Olga, mi Soni.

Hablando de personas que siempre llevaré en esta maleta no me puedo olvidar de ti Maca. Contigo hace falta facturar maleta. Las cosas a veces no salen como queremos, pero como dice alguien que quiero mucho, debajo del invierno siempre sube la primavera y tú te mereces lo mejor. Porque hace mucho tiempo que dejaste de ser mi compañera para convertirte en mi gran amiga y aunque a veces me quieras asesinar, sé que el fondo que me quieres tanto como yo a ti. Este es nuestro año y que el fin del mismo nos pille bailando (en algún festival, probablemente y con tinto de verano incluido).

Por supuesto, todo viaje se llena de personas increíbles. Gente que va, viene y gente que perdura para siempre. Aquí formé una gran familia, mi Tiahuanaco. Vosotros habéis sido mi fuerza, mis aventuras. Dr. Juanma, has sido la primera persona en hablarme en llegar al laboratorio, en integrarme. Tienes un corazón tan grande que no te cabe en ese gran cuerpo que tienes. Eres un ejemplo para mí de superación, constancia. Tu etapa aquí no fue fácil, pero siempre, siempre, has podido con todo. Eres un miembro activo de Cruz Roja, feminista, se te puede pedir algo más en la vida? Si, a veces que bajes el tono. Pero solo eso, ah y una cosa más....que te quedes siempre con nosotros, nos haces increíblemente bien, ya sabes lo mucho que te echo de menos. Fonti, nuestra aventura comenzó en 2009, en Salamanca. Ante todo, te doy las gracias porque a lo largo de estos años nuestra amistad no sólo perdure (cosa no es tan fácil), sino que cada día haya ido a más. Eres una persona fantástica, transmites cosas muy bonitas. Estoy segura que en la vida todo te irá bien, porque a la gente maravillosa le pasan cosas increíbles. Por todos esos planes, cañas, juegos de mesa y aventuras que no han hecho más que empezar. Porque como diría un grupo que siempre me recordará a ti, a nuestra Salamanca: me importan los de verdad, los que comparten mis días. Aunque el orden de factores no altere el producto, no podría haber terminado esta tesis sin ti Leti, mi Lettuce. Quizás llegaste cuando este camino ya estaba andado, pero sin duda llegaste justo a tiempo para subirte a esta furgo. Justo cuando pensaba que ya nada más me animaría, apareciste tú. Gracias por venir a desordenarme el grupo, la cabeza y también un poco el corazoncito. Gracias por tus locuras, nuestros viajes, nuestras charlas infinitas y por hacerme increíblemente feliz aquí dentro. Por decirme que puedo y debo confiar en mí. Gracias por decirme lo más bonito que me habría podido decir un compañero en la vida y es que brillo sin necesidad de apagar a los demás. Permíteme decirte que tú también brillas mucho compañera! Una cosa más te voy a decir, siempre, siempre que te gires en la poyata estaré yo para que puedas contar conmigo y como diría Sabina no hasta dos o diez, sino conmigo. Con vosotros no necesito nada más que lo que cabe en una hemper!

Hablando de Nefro, no tan nefro, pero sí. Muchas gracias a Ricardo por las reflexiones de la vida y sobre todo a mi pareja policial favorita de la FJD: gracias a Dani y a Álvaro. Habéis sido un apoyo increíble aquí. Dani por nuestras comidas de los viernes, estoy segura que el Karma existe y hará que todo vaya rodado a partir de ahora. Gracias Alv, ante ti no tengo palabras por ser todo lo bueno que has sido y sigues siendo conmigo. Por aquellos tiempos de Cosmopolitan, conversaciones de Whatsapp infinitas y algún que otro sábado cargando geles, que hacías que fueran hasta divertidos. Porque indi de vinindi...

Quizás, la mayor parte de mi familia de la FJD atraviesa las fronteras de Nefro. Muchas gracias a la gente de nuevas terapias, a Rocío, a Susana, Luz y en especial a ti Alex. No sabes lo que echo de menos nuestras locuras a través del pasillo. Sólo tu podrías convertirte en doctor con esa gracia ;) Nos vemos pronto. Gracias a esa gente de lípidos, a Leti y sobre todo a Olaya, por ser un cielo de personita y una peluquera fantástica. A la gente de inmuno en especial a Toño, Bea, Selene, Charly y Van. Por ser gente encantadora y siempre dispuesta a ayudar!

Como no, esta última época me ha cautivado mi AP. Gracias a Paula, a Marta, por ser tan majas y simpáticas, pero sobre todo a mis latineros domingueros y a Marta Sanz. Habéis hecho que mis findes aquí hayan cambiado a increíblemente mejor. Habéis sido un gran apoyo, sobre todo en esta etapa final. Por nuestras cenitas y bailoteos, pero también por nuestras charlas sobre la vida. Habéis pasado de ser los chicos de enfrente, a ser mis amigos. Muchas gracias Mel, por estar siempre pendiente de mí, por cuidarme y permitirme formar parte de vuestro grupo, todo irá bien y juntas mejor. Muchas gracias Ruth, por ser la alegría en persona, por hacerme reír hasta que me duela la tripa, por Habanera era era.... Gracias también a ti Ion, el cromosoma Y del grupo, por dar en ocasiones ese toque de cordura, aunque tú seas el menos cuerdo de todos. Como no me podría olvidar de mi segundo hogar, gracias a toda la gente de reuma. Gracias en especial a Anita Esbrit, a Ana y a Paula, por ser encantadoras, a mi Fran, murciano favorito, por tu gran simpatía y a mi gran debilidad, mi Juampa, porque todavía nos queda algún que otro bar que cerrar, mi sofá siempre estará disponible para ti.

Gracias al personal del animalario a los Carlos, a Irene, a Juani y a Diego, por vuestra ayuda este tiempo. A todos los ratoncitos de laboratorio que han dado su vida, espero que no en vano, por algún día conseguir frenar la enfermedad renal. A Curra, por esas charlas en el confocal. Y a mis auxiliares favoritas. Gracias Julia por todo lo que me has ayudado este tiempo, por ese humor que te caracteriza. Gracias a Amelia y por supuesto no me puedo olvidar de ti Pilar, no sabes lo que te echo de menos, disfruta de esta etapa increíble. A los chicos del almacén, en especial a Paquito y Álvaro y a Isa de correos.

Hablando de hogares, cierro este apartado dedicado a lo que ha sido mi gran hogar aquí. Gracias Sandra por ser la persona que más ha cautivado mi corazoncito. Es increíble como dos biotecs desconocidas en Salamanca se han vuelto inseparables en Madrid. Gracias por ser el mejor hombro del mundo en el que llorar y por provocarme las mayores sonrisas. A ti te escribiría un libro entero agradeciéndote que hayas

entrado en mi vida. Ya te lo he dicho muchas veces, pero sea el lugar del mundo en el que estemos, siempre me tendrás cerca. Gracias por presentarme a toda esa gente fantástica que te rodea y ahora, por suerte, me rodea.

Quería dar las gracias al ISCIII, por financiar gran parte de mi doctorado y a la REDinREN por financiar esta etapa final. Por supuesto al IIS-FJD y a la UAM, así como a todo el programa de doctorado en Farmacología y Fisiología, en especial a Concha Peiró por ayudarme con todo.

Una parte muy importante de todo esto ha sido a la gente que he conocido en Madrid, fuera de la FJD. Gracias a mis ángeles de Álex. Gracias a Bea y a Estrella, por aquellas clases de inglés horribles que hacíais que las horas pareciesen minutos. Por nuestros ataques de risa, por que la vida es una Berenjena! Me ha encantado conocerlos y por cierto, preparad la furgo, nos vamos de viaje. Sin duda, uno de los mayores apoyos en Madrid has sido tú Tania. Aunque tú me acompañabas en este viaje desde Pontevedra, aquí hemos cultivado mucho más nuestra amistad. GRACIAS por preocuparte tanto por mí, por integrarme en todo, por permitirme acoplarme a TODOS tus planes, por presentarme a un montón de gente maravillosa, por esos 8 y medio y por todo lo que nos queda por vivir. Por este grupo tropical con nuestra querida Lucía! Muchas gracias a todas las nuevas personas que he conocido este año, en especial a quien me ha mostrado que no se ha venido a esta vida a perder el tiempo, todo lo mejor está por llegar!

Gracias al ballet, porque bailar es el único vicio que no mata. Por ser mi vía de escape, mis ratitos de paz. Gracias a toda esa gente que conocí en Stylo, y sobre todo a mi Tres en Danza. Gracias a mis profes, en especial a Cris, a Juan, a Bea y sobre todo a mi Anita, por no solo bailar conmigo dentro de la academia, sino por bailar también fuera.

Esta tesis no habría sido posible sin mi formación en la Universidad de Salamanca. Gracias al grupo de JJ García Marín, sobre todo a Rocío, Marta, Oscar, Elisa H, Elisa L, Ester y Javi, por formarme y hacer que me picase el gusanillo de la investigación. Sin vosotros habría sido imposible. Gracias también a mis profesores del IES Príncipe Felipe y del Instituto a Xunqueira II de Pontevedra. A mi profesor Lorenzo, por creer en mí SIEMPRE. A mis profesores de Biología, en especial al profesor Luis Alberto Samartin, por ese entusiasmo y hacer que esto me encante.

De Salamanca me llevo lo mejor. Muchas gracias a mis Cominos, a Guada, Ro, Eu, Coru, Laura y Andrea, por ser mi familia allí y ahora. Por enseñarme el verdadero valor de la amistad. Gracias porque pese a los años, siempre encontremos un hueco para vernos. Porque una cosa nos prometimos, nunca estaremos a más de un avión de distancia. Porque nos esperan unos viajes del imsero increíbles juntas. A Noa, por ser mi espíritu revolucionario. Por conectar desde el minuto uno, por toda una vida universitaria juntas y espero que lo que queda.

A mis amigos de Pontevedra, de Senos va de las... (Mario, Carlos, Pedro, Hugo, Juan, Cebo, Henrique, Riki....y un largo etc) por todos estos años juntos, por esas charlas

filosóficas en la Franeta. Gracias también a mi núcleo Jon, por ser una constante en mi vida y a las cucaggachotas, OJALÁ se repitiese Amsterdam, A María, Tamara, Sara, Liste y en especial a ti Andrea. Gracias por pintar esta preciosa portada y por enseñarme que las distancias son sólo un detalle más en la historia. Aunque de pequeñas tuvieran que separar una playa por nosotras, a día de hoy creo que no habrá océano que nos separe.

A lo largo de este viaje he tenido varias paradas en un lugar de la Mancha de cuyo nombre sí quiero acordarme, Sonseca. Muchas gracias a la familia Martin-Fernández por todo el cariño durante todo este tiempo. Muchas gracias a los Friends y sobre todo muchas gracias a ti LF, por tanto. Tú has sido un fuerte impulsor de esta aventura en la ruta A66. La vida es como una montaña rusa, a veces estamos muy arriba y otras muy abajo, pero lo importante es todos los momentos que vivimos y da igual cuál sea el de ahora, vivamos siempre la vida, como hemos hecho hasta ahora, hacia rutas salvajes. Ya lo decía McCandless, la felicidad ...

Muchas gracias a la persona con el corazón más grande que he conocido en mi vida, Juan. Gracias monito, mi Juani Banani, por cuidarnos tanto a mí, a papá, a mamá. Por todo lo que has hecho por mí estos años. Tú me has enseñado a que cuando las cosas se tuercen, uno se levanta. Gracias por tenderme siempre tu brazo, sin pedir nada a cambio. Por todos esos días de verano con la música a tope en el corsita, por nuestros viajes, nuestra noche estival imperdonable en las Cíes, nuestras palizas mutuas a la escoba, los piruletas que no nos tomamos, los cheques gourmet con buena sera, alguna que otra canción de M-clan y recuerda siempre que cuando maduras, búscame! Te estaré esperando en los columpios...

Gracias a la parte constante en la vida de una persona, a la familia. Gracias a mis tíos Agustín (el padrino!), Iso, Ana, Suso, Ernesto, Chus, Jose y Mari. Gracias a mis primos Dani, Anita (+2), Edu, Raquel, Andrea, Zoe, Bibi, por vuestro apoyo todos estos años. Por supuesto como no, a mi madrina, por no sólo ejercer ese rol, sino también el de amiga. Aunque a veces choquemos, ya sabes que al acceder a ser mi madrina te tocará cuidarme siempre, al igual que yo a ti, ya sabes lo especial que eres para mí. Muchas gracias a mi abuela Gina, la más veterana de esta familia. Ejemplo de fuerza y amor por la vida, ojalá puedas seguir viéndome crecer y contándome historias de tu juventud mucho más.

Pero todo viaje culmina y empieza en un mismo punto. Los auténticos protagonistas de este viaje, mis padres, meus feitiños. Gracias en primer lugar, por darme la vida, que ya empezó pisando fuerte con un bebé con tres riñones que acabó investigando la enfermedad renal...ironías de la vida ¿no creéis? Gracias por dejarme la mejor herencia que me habríais podido dejar en la vida, mi educación y no sólo la que se aprende en el colegio y la Universidad, que soy consciente de todos los esfuerzos y vacaciones no vividas que supuso, sino la moral. Gracias por enseñarme que lo más importante en la vida es disfrutar de las pequeñas cosas, gracias por decirme que anteponéis mi felicidad a mis éxitos. Gracias por tantas visitas cuando os he necesitado, por llorar mis penas y reír mis alegrías. Gracias por dejarme volar sola, pero gracias por manteneros siempre abajo, en el suelo, para cuando me caiga de la nube, siempre estará ahí para

recogerme. No sabéis la suerte que he tenido y cada año que pasa me siento la mujer más orgullosa del mundo al decir que soy la persona más rica del mundo, no en dinero, sino en cariño. Os quiero.

Ahora bien, yo he venido aquí a hablar de mi libro, pero por último quiero dedicar esta tesis a las estrellas que hoy más brillan. Como vosotros decíais, “a vosa moneca” está hoy muy contenta al saber que alguien hoy en algún lugar estará cantando y bailando (esa jota que siempre dijimos que cantaríamos hoy y que ha llegado tarde), incluso haciendo música con tapas de ollas, platos y copas desde “el mar de la Habana y rumbo a Nueva York en un barco de vela”, aunque por supuesto “solamente una vez” más, desearía que estuvieseis aquí para celebrarlo conmigo. Esto va por vosotros abuelos!

# ÍNDICE

IN

■ Índice.....	17
■ Resumen .....	21
■ Abstract.....	23
■ Listado abreviaturas .....	25
■ 1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1. Fisiopatología renal.....	35
1.1.1. El riñón y sus funciones .....	35
1.1.2. El daño renal.....	35
1.1.3. Fracaso renal agudo.....	35
1.1.4. Enfermedad renal crónica .....	36
1.2. Búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas mediante biología de sistemas ...	38
1.3. Procesos clave en el daño renal: muerte celular, inflamación y fibrosis.....	39
1.4. Inflamasomas.....	42
1.4.1. Concepto de Inflamasoma .....	42
1.4.2. Estructura y tipos de NLR.....	43
1.4.3. Descripción de los diferentes inflamasomas .....	45
1.4.4. Regulación del inflamasoma .....	46
1.4.5. Mecanismos de activación del inflamasoma .....	46
1.4.6. El inflamasoma en la enfermedad renal .....	48
1.4.7. NLRP6 .....	51
1.5. El factor de transcripción NF-κB .....	57
1.5.1. Activación de NF-κB .....	58
1.5.1.1. Activación de la vía canónica de NF-κB .....	58
1.5.1.2. Activación de la vía no-canónica de NF-κB .....	59
1.5.2. Activación de NF-κB en células renales .....	60
1.5.3. NF-κB en la enfermedad renal.....	60
■ 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	65
Hipótesis .....	65
Objetivos.....	65
■ 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
3.1. Modelos Animales .....	69
3.1.1. Modelo experimental de fracaso renal agudo nefrotóxico .....	69

3.1.2.	Modelo experimental de obstrucción ureteral unilateral (UUO).....	71
3.2.	Cultivos celulares.....	72
3.2.1.	Líneas celulares.....	72
3.2.2.	Estudios de silenciamiento (siARNs) .....	73
3.2.3.	Inhibidores.....	73
3.2.4.	Agentes profibróticos .....	73
3.3.	Análisis de proteínas.....	74
3.3.1.	Extracción y cuantificación .....	74
3.3.2.	Western Blot.....	74
3.4.	Transcriptómica .....	75
3.4.1.	RNA-seQ .....	75
3.4.2.	Arrays transcriptómicos.....	76
3.5.	Minería de datos.....	76
3.6.	ELISA .....	77
3.7.	Análisis de ARN .....	77
3.7.1.	Extracción de ARN .....	77
3.7.2.	Transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real.....	77
3.8.	Inmunohistoquímica.....	78
3.9.	Estudios de muerte celular en células cultivadas .....	81
3.10.	Estadística.....	81
3.11.	Esquema resumen del abordaje experimental.....	81
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
4.1.	Identificación de <i>Nlrp6</i> como gen de interés en la patogenia del daño renal .....	87
4.1.1.	La expresión génica de <i>Nlrp6</i> está disminuida durante el FRA murino.....	87
4.1.2.	<i>Nlrp6</i> es el gen NLR con mayor expresión constitutiva en el riñón adulto murino sano.....	88
4.1.3.	Los niveles de expresión de ARNm de <i>NLRP6</i> se correlaciona inversamente con la TFGe en biopsias humanas .....	89
4.1.4.	Priorización de <i>Nlrp6</i> para estudios detallados de su función durante el daño renal..	91
4.2.	<i>Nlrp6</i> podría ser un gen nefroprotector en el FRA .....	91
4.2.1.	La expresión de <i>NLRP6</i> en células tubulares renales disminuye durante el FRA nefrotóxico .....	91
4.2.2.	La deficiencia de <i>Nlrp6</i> aumenta la gravedad del FRA nefrotóxico.....	94
4.2.3.	<i>NLRP6</i> protege a las células tubulares de la apoptosis y disminuye las respuestas inflamatorias.....	99
4.2.4.	La respuesta inflamatoria producida por el silenciamiento de <i>Nlrp6</i> requiere la activación de la vía de las MAPK.....	100



4.3.	Caracterización del papel de NLRP6 durante la ERC.....	102
4.3.1.	La expresión renal de NLRP6 disminuye durante la fibrosis experimental .....	102
4.3.2.	La deficiencia de <i>Nlrp6</i> agrava la inflamación y fibrosis durante la ERC experimental.....	104
4.4.	Expresión <i>in vivo</i> de NLRP6 en el intestino tras el daño renal .....	110
■ 5.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	117
5.1.	NLRP6 se expresa en el riñón sano y tiene un papel nefroprotector durante el FRA .....	117
5.2.	El papel antifibrótico de NLRP6 durante la ERC experimental.....	123
5.3.	Expresión de NLRP6 en el intestino tras el daño renal .....	127
■ 6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	135
■ 7.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	139
■	<b>Anexos</b> .....	161

## Resumen

NLRP6 es un miembro recientemente descrito y poco caracterizado de la familia de receptores tipo NOD (NLR). NLRP6 es el único miembro de la familia de los NLR descrito hasta la fecha que es capaz de formar el inflamasoma clásico y el no clásico así como de regular negativamente las vías inflamatorias de NF- $\kappa$ B y de las MAPK. NLRP6 se encuentra altamente expresado en las células epiteliales intestinales, donde parece desempeñar un papel protector, regulando la interacción con la microbiota intestinal. Sin embargo, la expresión y la función de NLRP6 en el riñón, un órgano estéril, aún no se han caracterizado.

Hemos explorado el papel de NLRP6 en el fracaso renal agudo (FRA). Mediante el análisis transcriptómico de un modelo de FRA nefrotóxico murino, observamos que *Nlrp6* es el gen de la familia NLR que más se expresa en los riñones sanos y es el gen de la familia cuya expresión más disminuye durante el FRA experimental. NLRP6 se expresa en el epitelio tubular de riñón humano y murino y su expresión disminuyó durante la lesión renal humana o el FRA nefrotóxico inducido por cisplatino o por una sobredosis de ácido fólico. La deficiencia genética de *Nlrp6 in vivo* causó un aumento de la fosforilación de las MAPK ERK1/2 y p38 en el riñón, un FRA más grave y una mayor inflamación renal. En células tubulares murinas cultivadas, el silenciamiento de *Nlrp6* por siARNs específicos aumentó la fosforilación de ERK1/2 y de p38 y la expresión del ARNm de quimiocinas proinflamatorias y disminuyó la expresión del gen nefroprotector Klotho. La inhibición de las MAPK previno *in vitro* la respuesta inflamatoria.

Se caracterizó también el papel de NLRP6 en la patogenia de la enfermedad renal crónica (ERC). Se buscaron los genes de la familia de los NLR en la base de datos Nephroseq de transcriptómica de riñones con ERC humana y se comprobó que *NLRP6* destacó por estar disminuido y por existir una correlación entre unos menores niveles de ARNm renales y una menor tasa de filtración glomerular estimada (TFGe). El papel de NLRP6 en la fibrosis renal se exploró en un modelo de ERC causado por obstrucción ureteral unilateral (UUO). La deficiencia genética de *Nlrp6 in vivo* aumentó la fosforilación de la MAPK p38 del riñón, la expresión de genes asociados a la matriz extracelular y la inflamación renal. *In vitro*, el factor profibrótico TGF- $\beta$ 1 disminuyó los niveles de expresión de ARNm de *Nlrp6*.

También evaluamos directamente el impacto de la lesión renal sobre la expresión intestinal de NLRP6. Durante el FRA experimental inducido por cisplatino o ácido fólico y en muestras humanas de pacientes con ERC, observamos una disminución de la expresión intestinal de NLRP6.

En conclusión, en un ambiente estéril, NLRP6 tiene un papel nefroprotector, amortiguando las respuestas inflamatorias y fibróticas, probablemente al prevenir la activación de las MAPK. Nuestros resultados también demuestran la existencia de un eje daño renal-intestino, por el cual la expresión intestinal de NLRP6 baja durante el daño renal. Se deberían estudiar estrategias terapéuticas que mantengan la expresión de NLRP6 para el tratamiento de la enfermedad renal.

## Abstract

NLRP6 is a recently described and poorly characterized member of the (NOD)-Like Receptor (NLR) family. NLRP6 is the only NLR member to date that is able to form the classical and the non-classical inflammasome and negatively regulate the NF- $\kappa$ B and MAPK inflammatory pathways. NLRP6 is highly expressed in gut epithelial cells where it appears to play a protective role, regulating the interaction with microbiota. However, the expression and function of NLRP6 in the kidney, a sterile environment, have not been characterized yet. We have explored the role of NLRP6 in acute kidney injury (AKI). By transcriptomic analysis of murine nephrotoxic AKI, we found that *Nlrp6* is the NLR family gene most expressed in healthy kidneys and the most significantly downregulated during experimental AKI. NLRP6 was expressed by healthy murine and human kidney tubular epithelium, and its expression was reduced during human kidney injury or murine nephrotoxic AKI induced by cisplatin or by a folic acid overdose. Genetic *Nlrp6* deficiency *in vivo* resulted in phosphorylation of kidney ERK1/2 and p38 MAP kinases and more severe AKI and kidney inflammation. In cultured murine tubular cells, *Nlrp6* downregulation induced by specific siRNAs resulted in upregulation of ERK1/2 and p38 phosphorylation, chemokine mRNA expression and downregulation of the nephroprotective gene Klotho. MAPK inhibition prevented the inflammatory response in *Nlrp6*-deficient cells.

The role of NLRP6 in the pathogenesis of chronic kidney disease (CKD) was also characterized. We searched the human transcriptomics Nephroseq database for NLR genes differentially expressed in progressive human CKD. *NLRP6* mRNA stood out as decreased in CKD kidney and low *NLRP6* mRNA expression correlated with decreased estimated glomerular filtration rate (eGFR). The role of NLRP6 in kidney fibrosis was explored in an accelerated model of CKD, unilateral ureteral obstruction (UUO). Genetic *Nlrp6* deficiency *in vivo* resulted in an upregulation of kidney p38 MAP kinase phosphorylation, upregulation of extracellular matrix-related gene expressions and more severe kidney inflammation after UUO. *In vitro*, the profibrotic factor TGF- $\beta$ 1 caused *Nlrp6* mRNA downregulation.

We also evaluated the impact of kidney disease on NLRP6 expression in other organs. During experimental AKI induced by cisplatin or folic acid and in human samples from patients with CKD, we observed that NLRP6 expression was downregulated in the colon as a consequence of kidney damage.

In conclusion, in a sterile environment, NLRP6 has a nephroprotective role, dampening inflammatory and fibrotic responses, probably by preventing MAPK activation. Our results also demonstrate the existence of a kidney damage-gut axis in which gut NLRP6 is downregulated during kidney injury. Upregulation of NLRP6 expression may be explored as therapeutic option in kidney disease.

## LISTADO ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En algunos casos se mantuvieron las siglas y también lo que éstas significan, entre “ ”, en inglés, debido a su recurrencia en el uso y a su dificultad en la traducción.

<b>AD</b>	Dominio transactivación Ácida
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
<b>AngII</b>	Angiotensina II
<b>AGCC</b>	Ácidos Grasos de Cadena Corta
<b>AIM2</b>	Proteína Ausente en Melanoma 2
<b>ALR</b>	Receptor tipo Ausente en Melanoma
<b>AMPs</b>	Péptidos Antimicrobianos
<b>AMPK</b>	Quinasa activada por Adenosin Monofosfato
<b>ANOVA</b>	Análisis de la Varianza
<b>AOM</b>	Azoximetano
<b>APAF-1</b>	Factor que activa proteasas 1
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>ASC</b>	“Apoptosis-Associated Speck-like Protein”
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato
<b>BAFF</b>	Factor de Activación de Células B Perteneciente a la Familia TNF
<b>BCA</b>	Ácido Bicinconínico
<b>BCR</b>	Receptor Células B
<b>BIR</b>	Dominio de Repetición Inhibitoria de Baculovirus
<b>BMP-7</b>	Proteína Morfogénica Ósea 7
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>BUN</b>	Nitrógeno Ureico en sangre
<b>CARD</b>	Dominio de Reclutamiento y Activación de Caspasas


<b>Casp-1</b>	Caspasa-1
<b>Casp-11</b>	Caspasa-11
<b>CCL2/MCP1</b>	Proteína Quimiotáctica de Macrófagos 1
<b>CCL5/RANTES</b>	Quimiocina Secretada y Expresada por Linfocitos T Normales Regulada por Activación
<b>CD</b>	Cúmulo de Diferenciación
<b>CD40L</b>	Ligando del cúmulo de Diferenciación 40
<b>CIITA</b>	Transactivador del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II
<b>CKD-EPI</b>	“Chronic Kindey Disease Epidemiology Collaboration”
<b>CLR</b>	Receptores de lectina tipo C
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CTGF</b>	Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
<b>CXCL</b>	“C-X-C (Cystein-X-Cystein) motif Chemokine Ligand 10”
<b>DAB</b>	Tetraclorhidrato de 3,3'-Diaminobenzidina
<b>DAMPS</b>	Patrones Moleculares Asociados a Daño
<b>DHX15</b>	“DEAH-Box Helicase 15”
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>DPX</b>	Resina Acrílica con base de Xileno
<b>DSS</b>	Dextrano Sulfato de Sodio
<b>DTA</b>	Dominio de Transactivación C-terminal
<b>ECMV</b>	Virus de ARN de la Encefalomiocarditis
<b>EDTA</b>	Ácido Dietilentriamina Pentaacético
<b>EEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica
<b>ERK</b>	Quinasa Regulada por Señales Extracelulares

<b>ERT</b>	Enfermedad Renal Terminal
<b>FADD</b>	Dominio de Muerte Asociado a Fas
<b>FasL</b>	Ligando de Fas
<b>FDR</b>	Tasa de Descubrimientos Falsos
<b>FIIND</b>	“Function to Find Domain”
<b>FPMK</b>	Fragmentos por Millón de Kilobases
<b>FRA</b>	Fracaso Renal Agudo
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
<b>GBD</b>	“Global Burden of Disease”, carga global de enfermedad
<b>GEFS</b>	Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria
<b>GSMD</b>	Gasdermina D
<b>HGF</b>	Factor Crecimiento de Hepatocitos
<b>HMGB1</b>	“High Mobility Group Box 1”
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rábano
<b>ICAM-1</b>	Molécula de Adhesión Intercelular-1
<b>IFI16</b>	Proteína Inducible por Interferón Gamma 16
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón Gamma
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Inhibidor del Factor Kappa B alfa
<b>IKK<math>\alpha</math></b>	Quinasa de I $\kappa$ B
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPAF</b>	Factor de Activación de Proteasa Convertidor de Interleucina
<b>IRAK1</b>	Quinasa Asociada al Receptor de IL-1
<b>KDIGO</b>	“Kidney Disease: Improving Global Outcomes”
<b>KIM-1</b>	Molécula-1 de Lesión Renal
<b>KLF</b>	Factor Parecido a Krüppel

<b>KO</b>	“Knock-Out”
<b>LeTx</b>	Toxina Letal del Ántrax
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido Bacteriano
<b>LRR</b>	Dominio Rico en Leucina
<b>LTA</b>	Ácido Lipoteicoico
<b>MAPK</b>	Quinasa Activada por Mitógenos
<b>MAVS</b>	Proteína Adaptadora Mitocondrial de Señalización Antiviral
<b>MCT</b>	Línea de Células epiteliales de Túbulo renal proximal de Ratón
<b>MDP</b>	Muramil Dipéptido
<b>MDRD</b>	“Modification of Diet in Renal Disease”
<b>MFGE8</b>	Factor de Crecimiento 8 del Glóbulo de Grasa de Leche
<b>MHC-II</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II
<b>miARNs</b>	Micro-ARNs
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de Matriz
<b>MPT</b>	Transición de Permeabilidad Mitocondrial
<b>MUC-2</b>	Mucina 2
<b>NAIP</b>	“NLR family Apoptosis Inhibitory Protein”
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
<b>NGAL</b>	Lipocalina asociada a Gelatinasa de Neutrófilos
<b>NlgA</b>	Nefropatía por IgA
<b>NIK</b>	Quinasa Inductora de NF-κB
<b>NLR</b>	Receptor Tipo NOD
<b>NLRC4</b>	“NLR family CARD domain-containing protein”
<b>NLRP</b>	“ <u>NLR</u> family <u>Pyrin</u> domain-containing”
<b>NLRP3</b>	“NLR family Pyrin domain-containing 3”
<b>NLRP6</b>	“NLR family Pyrin domain-containing 6”
<b>NLRX</b>	“NLR family member X”

<b>NOD</b>	Dominio de Oligomerización y unión a Nucleótidos
<b>NTN</b>	Nefritis Nefrotóxica
<b>p38</b>	Quinasa Activada por Mitógenos p38
<b>P-p38</b>	Quinasa activada por mitógenos p38 fosforilada
<b>PAMPS</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino
<b>PBST</b>	Tampón Fosfato Salino con Tween
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>P-ERK</b>	Quinasa Regulada por señales Extracelulares Fosforilada
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor del Peroxisoma activador por Proliferador Gamma
<b>PPM1A</b>	Proteína Fosfatasa dependiente de Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> 1A
<b>PRR</b>	Receptores de Reconocimiento de Patógenos
<b>PYD</b>	Dominio Rico en Pirina
<b>PVDF</b>	Fluoruro de Polivinilideno
<b>RANKL</b>	Ligando de Receptor Activador de NF- $\kappa$ B
<b>RIG-I</b>	Gen Inducible por Ácido Retinoico
<b>RIPK1</b>	Serina/treonina Proteína Quinasa que Interactúa con el Receptor 1
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>RPM</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>RT-QPCR</b>	Retrotranscripción y PCR cuantitativa a Tiempo Real
<b>RXR</b>	Receptor Retinoide X
<b>siARNs</b>	ARNs de silenciamiento
<b>SMAD</b>	Homóloga de la proteína de <i>Drosophila</i> MAD y la proteína SMA de <i>C. elegans</i> . El nombre es una combinación de los dos.
<b>STAT-3</b>	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3





<b>TBST</b>	Buffer Salino-Tris con Tween20
<b>TdT</b>	La Desoxinucleotidil Transferasa Terminal
<b>TEM</b>	Transición Epitelio-Mesénquima
<b>TFG</b>	Tasa Filtración Glomerular
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ 1
<b>TFGe</b>	Tasa Filtración Glomerular estimada
<b>Th17</b>	Linfocitos T Helper 17
<b>THP-1</b>	Línea celular Monocítica Humana
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>TRAF</b>	Factor Asociado al Factor de Necrosis Tumoral
<b>TRAIL</b>	Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionada con el Factor de Necrosis Tumoral
<b>TUNEL</b>	“Deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling”
<b>TWEAK</b>	Inductor Débil de Apoptosis Similar al Factor de Necrosis Tumoral
<b>UTP</b>	Uridina Trifosfato
<b>UUO</b>	Obstrucción Ureteral Unilateral
<b>WB</b>	“Western Blot”
<b>WT</b>	Tipo salvaje
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina del Musculo Liso alfa

\* Cuando se trate de símbolos referentes a genes murinos su nomenclatura a lo largo de esta tesis será con la primera letra en mayúscula, el resto en minúsculas y en cursiva.

\*\* Cuando se trate de símbolos referentes a genes humanos su nomenclatura a lo largo de esta tesis será con todas las letras en mayúscula y en cursiva.

\*\*\* Cuando se trate de símbolos referentes a proteínas humanas y murinas su nomenclatura a lo largo de esta tesis será con todas las letras en mayúscula y sin cursiva.

# Introducción



*“Grande es aquel que para brillar no le  
hace falta apagar la luz de los demás”*  
ANÓNIMO

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Fisiopatología renal

### 1.1.1. El riñón y sus funciones

Los riñones son un par de órganos vitales con forma de alubia que realizan funciones fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis del organismo<sup>1</sup>. La función principal de los riñones es el filtrado del plasma, pero además tienen otras funciones:

1. Mantenimiento del equilibrio ácido-base de los fluidos corporales.
2. Mantenimiento de la osmolaridad y la composición de los electrolitos.
3. Excreción de productos de desecho del metabolismo y excreción de sustancias extrañas en la orina.
4. Regulación de la presión arterial.
5. Producción de hormonas incluyendo la eritropoyetina (que estimula la producción de glóbulos rojos), la renina (implicada en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, regulador del volumen extracelular y de la presión sanguínea), la vitamina D activa o calcitriol (que permite regular los niveles de calcio) y el factor anti-envejecimiento Klotho.
6. Gluconeogénesis<sup>1,2</sup>.

### 1.1.2. El daño renal

Existen diferentes tipos de nefropatías que se clasifican en función de la zona del riñón que se encuentra más afectada pudiendo ser glomerulares, túbulo-intersticiales o vasculares. En función de cómo evolucionen pueden clasificarse en agudas, como el fracaso renal agudo (FRA) o crónicas, como la enfermedad renal crónica (ERC). El FRA favorece la progresión de la ERC y la ERC, a su vez, es el principal factor de riesgo para el FRA, estando ambos síndromes interconectados. El FRA y sobre todo la ERC pueden progresar a enfermedad renal terminal (ERT), que requiere sustitución de la función renal con diálisis o trasplante<sup>3</sup>.

### 1.1.3. Fracaso renal agudo

El FRA es una disminución abrupta en la función renal con una acumulación de productos del metabolismo del nitrógeno como creatinina, urea y otras sustancias de desecho, que cursa, en ocasiones, con una disminución del volumen de orina, acidosis

metabólica y un aumento en las concentraciones de fosfato y potasio<sup>4</sup>. Tiene una alta incidencia y mortalidad. En la actualidad el FRA se define según la guía internacional del consorcio KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) de 2012 como un aumento en los niveles de creatinina sérica  $\geq 0,3$  mg/dl ( $\geq 26,5$   $\mu$ mol/l) en 48 horas o un aumento de la creatinina sérica 1,5 veces sobre los valores basales, que se supone que ha ocurrido durante los 7 días anteriores; o un volumen de orina  $< 0,5$  ml/kg/h durante 6 horas<sup>5</sup>. Durante el FRA humano, se suceden una serie de cambios morfológicos que incluyen la muerte de células tubulares, seguido de una desdiferenciación tubular, proliferación, regeneración y todo ello acompañado de un proceso inflamatorio<sup>6,7</sup>.

El FRA suele ser reversible, pero presenta una elevada mortalidad, en torno al 50% y no existe un tratamiento efectivo que permita prevenir su progresión a FRA grave o ERC o acelerar la recuperación de la función renal. Los ensayos clínicos realizados de los fármacos para tratar el FRA basados en la experimentación animal han fallado<sup>4</sup>, por lo que la terapia de reemplazo renal mediante técnicas de diálisis o hemofiltración hasta la recuperación espontánea de la función renal es la única terapia conocida y establecida a día de hoy para el tratamiento del FRA<sup>8</sup>.

Los modelos experimentales de FRA nos permiten abordar su patogenia en busca de posibles alternativas terapéuticas. El FRA experimental inducido por ácido fólico comparte con el FRA humano la presencia de apoptosis en las células tubulares, la proliferación compensatoria de estas células que conduce a la regeneración, la infiltración de células inflamatorias y en una fase crónica, la fibrosis leve<sup>9,10</sup>. En el FRA por ácido fólico<sup>11</sup> y en otro tipo de FRA como en el inducido por cisplatino, están aumentados un gran número de citocinas y quimiocinas que facilitan el infiltrado de leucocitos en el riñón<sup>12</sup>.

#### 1.1.4. Enfermedad renal crónica

Según la guía internacional del consorcio KDIGO de 2012 la ERC se define como anomalías en la estructura renal o en su función, que persiste más allá de tres meses y que tiene implicaciones para la salud. Por ello, el diagnóstico de la ERC se hace en presencia durante más de tres meses de un marcador de daño renal como la albuminuria ( $>30$ mg/24h o Albuminuria/creatinuria  $>30$ mg/g) o por anomalía del sedimento urinario o de electrolitos debidas a trastornos tubulares o anomalías histológicas, o anomalías estructurales detectadas por imagen, o historial de trasplante renal o una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) (TFG  $<60$ ml/min/1.73 m<sup>2</sup>)<sup>13</sup>. La ERC se puede clasificar en función de la TFG (categorías G1 a G5) y de la albuminuria (categorías A1 a A3). El aumento en las categorías de ERC se asocia con un aumento de los riesgos de progresión de la ERC y muerte. En la actualidad se ha vuelto

muy popular la representación de estas categorías en un mapa de calor que denota el riesgo de progresión de ERC o muerte (**Figura 1**)<sup>13</sup>.

**Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category**

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1 Normal to mildly increased  <30 mg/g <3 mg/mmol	A2 Moderately increased  30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	A3 Severely increased  >300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red: very high risk

**Figura 1: Mapa calor categorías ERC.** El color verde significa sin riesgo, el amarillo un incremento moderado del riesgo, el naranja riesgo elevado y el rojo riesgo muy elevado <sup>13</sup>.

La ERC tiene una alta prevalencia, aproximadamente uno de cada diez adultos padece de ERC. Según el estudio del “Global Burden Disease” (GBD), que mide anualmente la salud de las poblaciones de todo el mundo por países, en 2016 la ERC era la octava causa de muerte en España. Además, se encontraba entre las 10 causas de muerte que más habían crecido entre 2006 y 2016, sólo por detrás del Alzheimer<sup>14</sup>. De hecho, se cree que a esta velocidad de crecimiento se convertirá en la segunda causa de muerte más frecuente en España para 2100<sup>15,16</sup>. Los tratamientos actuales enlentecen el proceso, pero no previenen su progresión. Existe un gran número de pacientes en terapia de reemplazo renal. De hecho el 0,1% de la población española es dializada o se encuentra trasplantada de riñón<sup>15</sup>. Sin embargo, el riesgo de muerte en pacientes con terapia de reemplazo renal sigue siendo muy elevado debido a que la diálisis sólo permite reemplazar entre el 5 y el 10% de las funciones renales totales, aparte de las limitaciones socio-económicas que sufren diferentes poblaciones para su acceso<sup>17,18</sup>. Por ello, el énfasis durante todos estos años de nuestro grupo de investigación y a lo largo de desarrollo de esta tesis doctoral, se ha centrado en identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan evitar la progresión de la ERC y posibles complicaciones.

## 1.2. Búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas mediante biología de sistemas

Los mecanismos por los cuales se originan y progresan las enfermedades renales son todavía poco conocidos. Los múltiples factores involucrados en la patogenia de las enfermedades renales<sup>19,20</sup> nos han hecho ver que el enfoque clásico de identificar un único gen candidato, basado en hipótesis generadas por conocimientos previos para el estudio de su función en la enfermedad, aporta una información muy limitada sobre los mecanismos moleculares subyacentes. Un enfoque no sesgado basado en la biología de sistemas, en los que se integra el modulado computacional con la recopilación a gran escala de cambios moleculares, podría ser útil para identificar los múltiples genes que interactúan entre sí, así como el producto de su interacción y que son, en su conjunto, responsables de la patogenia y progresión de la enfermedad<sup>21</sup>. Además, permiten seleccionar genes de potencial interés patogénico de función desconocida hasta el momento (a los que no se habría podido llegar mediante el abordaje clásico basado en hipótesis) en base a cambios de expresión durante el daño renal.

Los avances en biotecnología han permitido recopilar un gran número de datos gracias a las técnicas denominadas –ómicas, que incluyen la genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica<sup>21,22</sup>, que describen el enfoque científico que tiene como objetivo estudiar una clase distinta de moléculas biológicas de manera global e integral. Estas técnicas, combinadas con análisis computacionales, nos permiten una comprensión más profunda de la patogenia de la enfermedad, ya que los organismos son complejos, interaccionan además con el ambiente, por lo que no puede ser descrita en detalle teniendo en cuenta sólo características individuales. Los biomarcadores derivados de estos estudios –ómicos nos permitirían detectar, de manera temprana, la enfermedad renal sin esperar su progresión a un estadio terminal. Sin embargo, estos estudios pueden llevar años y son difíciles de realizar por a la baja incidencia de algunas nefropatías y por el gran desequilibrio entre la gran cantidad de datos –ómicos y la escasez de datos clínicos de pacientes homogéneos con seguimiento a largo plazo. Esto hace necesario el desarrollo de estudios colaborativos nacionales e internacionales para la recogida de un gran número de muestras de pacientes con una enfermedad renal perfectamente clasificada<sup>21</sup>. La orina es una fuente prometedora de biomarcadores para una gran variedad de enfermedades, incluyendo las renales<sup>23,24</sup>. A lo largo de todos estos años, en nuestro grupo de investigación se han empleado estas técnicas para identificar un conjunto de nuevos posibles genes implicados en la enfermedad renal que nos permitan diagnosticar la enfermedad, monitorizar su progresión e identificar nuevas dianas terapéuticas<sup>25–32</sup>.

### 1.3. Procesos clave en el daño renal: muerte celular, inflamación y fibrosis

Tanto el FRA como la ERC se caracterizan por la pérdida de células tubulares<sup>33,34</sup>. Durante el FRA, se produce una muerte y lesión subletal de células tubulares, con desaparición del borde en cepillo que se sigue de proliferación celular compensatoria durante el proceso de regeneración y una segunda fase de muerte celular que ya ajusta el número final de células. Todo esto produce una disminución de la TFG y un aumento recíproco de los niveles de urea y creatinina sérica<sup>35,36</sup>.

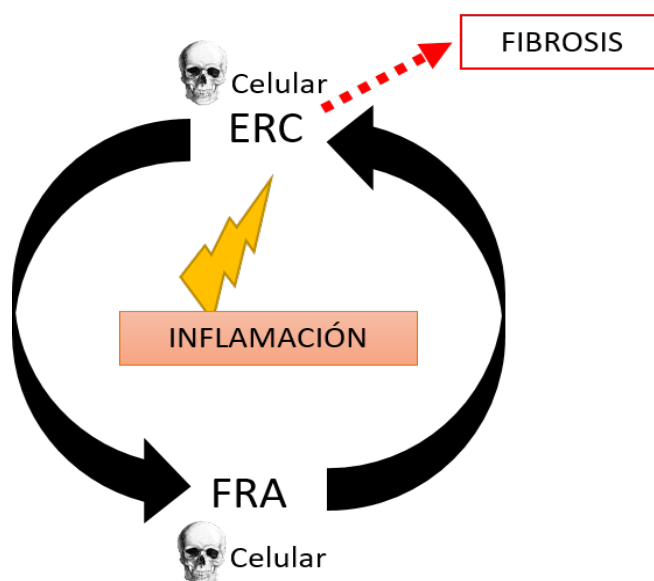
En términos generales, la muerte de las células renales se puede englobar en dos procesos diferenciados y con distinta regulación, la apoptosis y la necrosis. La apoptosis o suicidio celular fue el primer tipo de muerte celular que se estudió y caracterizó ampliamente en el FRA y que puede ejecutarse por dos tipos de vía: la intrínseca y la extrínseca<sup>37</sup>. La vía intrínseca se inicia por estrés celular que da lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa que resulta en la liberación de factores apoptogénicos, como el citocromo c, que luego se une a APAF-1 en un complejo multiproteico denominado apoptosoma, para activar la caspasa-9. Por otro lado, la vía extrínseca se ejecuta a través de receptores de muerte celular, incluyendo receptores para TNF $\alpha$ , FASL y TRAIL<sup>38,39</sup> que reclutan proteínas adaptadoras y que posteriormente activan la caspasa-8<sup>40</sup>. La activación de la caspasa-8 y 9, da lugar finalmente a la activación de caspasas ejecutoras, como la caspasa-3 y por consiguiente, la muerte celular. Las células apoptóticas expresan en su superficie señales reconocidas por receptores de macrófagos y por receptores de células dañadas, pero vivas, como KIM-1<sup>41,42</sup>, por lo que las células apoptóticas son engullidas por células adyacentes antes de que se pierda la integridad de la membrana y se liberen factores proinflamatorios. Durante la lesión renal mueren por apoptosis diferentes tipos de células renales como las endoteliales, tubulares proximales, distales y los podocitos<sup>43</sup>. Sin embargo, los inhibidores de las caspasas no ofrecen una protección eficaz en la mayoría de las situaciones preclínicas y además, las caspasas tienen funciones no apoptóticas durante la inflamación, proliferación celular y desdiferenciación, lo que hace que sean dianas terapéuticas complejas<sup>37</sup>. La principal diferencia entre la apoptosis y la necrosis, es que la apoptosis no es un tipo de muerte celular inflamatoria, ya que se mantiene la integridad de la membrana, mientras que en la necrosis, la integridad de la membrana plasmática se pierde y las células necróticas liberan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y alarminas, que activan células renales intrínsecas e inmunes dando lugar a una amplificación de la muerte celular y al reclutamiento de respuesta inmunes e inflamatorias<sup>36</sup>. Existen diversas formas de necrosis regulada, como necroptosis, ferroptosis, piroptosis y necrosis dependiente de la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT)<sup>44-47</sup>, que también contribuyen a la patogenia del FRA nefrotóxico<sup>36</sup>. Una respuesta inflamatoria



exacerbada también se relaciona con fenómenos de muerte celular<sup>44,48</sup>. Así, la citocina TWEAK induce apoptosis de células tubulares en presencia de una combinación de otras dos citocinas proinflamatorias, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  y el bloqueo de TWEAK en modelos experimentales de FRA y ERC disminuye la muerte de células tubulares<sup>49,50</sup>. Este conocimiento permitiría en el futuro diseñar abordajes terapéuticos frente a diferentes formas de muerte celular en la enfermedad renal.

Además de la muerte celular, la inflamación es otra característica importante del daño renal y a ello contribuyen tanto las células renales intrínsecas como las células inflamatorias<sup>51,52</sup>. En estos tipos celulares se disparan señales intracelulares proinflamatorias, principalmente a través de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B<sup>53</sup>, que conducen a la síntesis de citocinas y quimiocinas necesarias para el reclutamiento e interacción de células infiltrantes del sistema inmune innato y adaptativo principalmente neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos. En conjunto, estas respuestas actúan de forma coordinada en procesos de recuperación de la lesión o, en caso de que persistan las causas que lo originan, pueden mantenerse y ser determinantes en la progresión de la enfermedad renal hacia la cronicidad<sup>51,54</sup> (**Figura 2**). Las células epiteliales del túbulo renal son consideradas el principal tipo celular capaz de producir un gran número de quimiocinas en respuesta a factores inmunes y no inmunes<sup>55,56</sup>. Las quimiocinas son un grupo de citocinas quimiotácticas que promueven el reclutamiento de leucocitos y que se secretan en respuesta a citocinas, activación del complemento, especies reactivas de oxígeno (ROS), señalización por NF- $\kappa$ B y por vías dependientes de receptores TLR<sup>35,51,54</sup>. En modelos experimentales de daño renal agudo, nuestro grupo ha observado un aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias como CCL2/MCP1, CCL5/RANTES, CXCL10, CXCL16 y una disminución de la expresión de genes antiinflamatorios como Klotho<sup>26,31,57,58</sup>. También contribuye a la inflamación renal, la expresión de receptores de la inmunidad innata tipo Toll (TLR) en células tubulares, vasculares y macrófagos. Los TLR son receptores de membrana que interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs o DAMPs), liberados por las células dañadas y desencadenan cascadas de activación de señales que resultan en la síntesis y la secreción de factores proinflamatorios que contribuyen decisivamente a la amplificación del proceso inflamatorio<sup>35</sup>.





**Figura 2: Esquema de la interconexión entre ERC y FRA, así como del papel fundamental de la inflamación, fibrosis y muerte celular en el daño renal.**

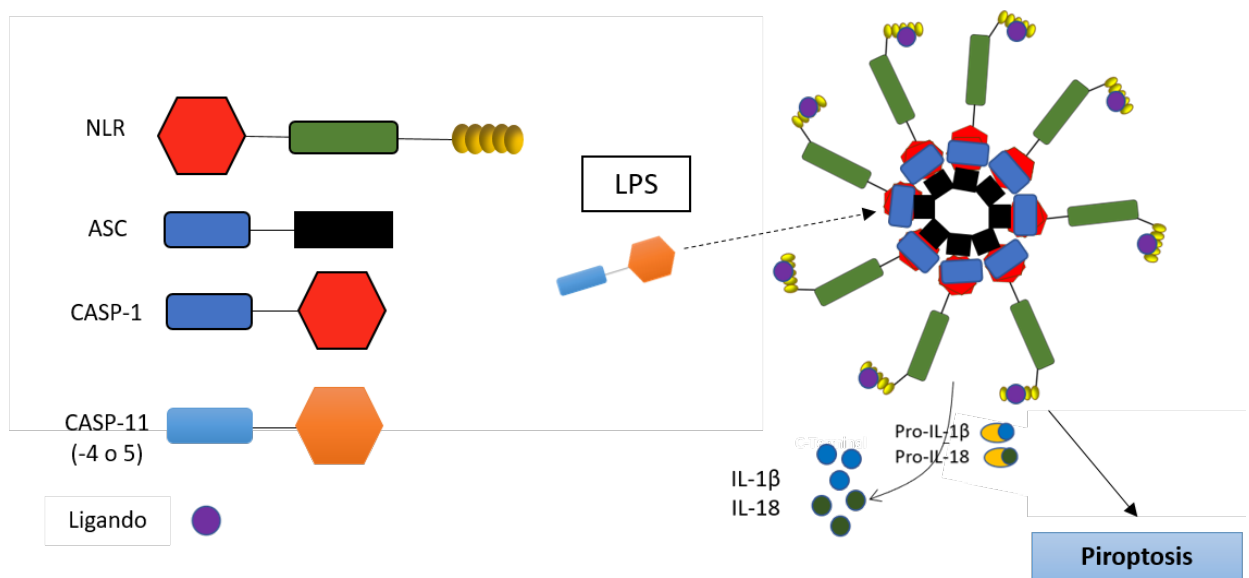
La fibrosis es un proceso crónico y progresivo que afecta a los riñones durante el envejecimiento y la ERC. La inflamación tiene un papel clave en la iniciación de la fibrosis. Cuando el proceso inflamatorio se desregula o no se resuelve, se produce un aumento del infiltrado de leucocitos, principalmente macrófagos, células dendríticas y células T en el riñón, que, junto con las células intrínsecas renales, células inmunes y fibroblastos, aumentan la producción de numerosos factores profibróticos como el TGF- $\beta$ 1, que es el principal mediador de la fibrosis renal. Además de TGF- $\beta$ 1, otros factores profibróticos que contribuyen al daño renal son CTGF, EGF, PDGF, así como moléculas de señalización intracelular como mTOR, NF- $\kappa$ B y KLF6<sup>59</sup>. Como consecuencia de esto, se produce la activación de fibroblastos intersticiales, principales productores de colágeno, fibronectina y proteoglicanos que son los componentes principales de la matriz extracelular. La excesiva producción de matriz, da lugar al reemplazo del tejido normal por tejido de cicatrización y a un reclutamiento de células profibróticas al glomérulo e intersticio renal<sup>60,61</sup>. Durante la fibrosis, los fibroblastos se activan y expresan la proteína  $\alpha$ -SMA, adquiriendo un fenotipo contráctil, pasándose a llamar miofibroblastos<sup>62</sup>. Los fibroblastos también producen quimiocinas y citocinas, que contribuyen al proceso inflamatorio como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TWEAK e IL-33<sup>59,62</sup>. Las quimiocinas atraen y reclutan a las células inmunes al lugar de la lesión y son mediadoras del proceso de angiogénesis, reclutamiento de fibroblastos y de la transición epitelio-mesénquima (TEM)<sup>59</sup>. Además de su papel profibrótico, TGF- $\beta$ 1 también puede tener un papel antiinflamatorio y protector<sup>63</sup>. Estudios recientes han identificado la existencia de factores antifibróticos endógenos que antagonizan las acciones fibrogénicas de TGF- $\beta$ 1, como IL-10, INF $\gamma$ , BMP-7, AMPK, HGF, KLF15 y vitamina D, lo que podría resultar interesante para desarrollar terapias

antifibróticas<sup>59</sup>. En resumen, la fibrosis renal implica interacciones complejas entre múltiples rutas de señalización celular inflamatoria, con la consecuente producción de citocinas. Además, los miofibroblastos están regulados por una variedad de señales, incluyendo señales paracrinas derivadas de linfocitos y macrófagos, así como autocrinas. La resolución de la inflamación y la regeneración, son procesos claves para el mantenimiento de la homeostasis tras el daño renal y para evitar su progresión hacia la fibrosis (**Figura 2**).

## 1.4. Inflamasomas

### 1.4.1. Concepto de inflamasoma

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que constan de un receptor tipo NOD (dominio de oligomerización y unión a nucleótidos, NLR) o de un receptor de tipo ausente en melanoma 2 (AIM2)(ALR)<sup>64</sup>, que a través de la proteína adaptadora ASC, da lugar a la activación de la pro-caspasa-1 a su forma activa, con la consecuente maduración y liberación de las citocinas proinflamatorias IL-18 e IL-1 $\beta$ , así como un tipo de muerte celular programada denominada piroptosis, que activa la defensa inmune innata<sup>65,66</sup>. También existe el inflamasoma no clásico que se desencadena por la detección citosólica del lipopolisacárido (LPS) y es dependiente de la caspasa-11 (caspasas-4 y 5 en humanos)<sup>67,68</sup> (**Figura 3**).



**Figura 3: El inflamasoma de NLR y sus componentes**

### 1.4.2. Estructura y tipos de NLR



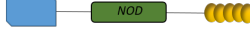

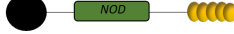
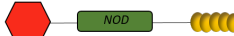

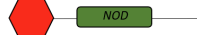
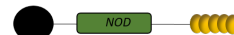
Los patrones PAMPs y los DAMPs, estimulan a los receptores de reconocimiento de patógeno (PRRs)<sup>69</sup>. La unión de los PAMPs o de los DAMPs a los PRRs, produce la activación de múltiples vías de señalización inflamatorias como la vía del factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) y la de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), las cuales regulan la expresión de los genes inflamatorios, inmunes y antivirales que resulta finalmente en el desarrollo de la inflamación y la activación de la inmunidad innata<sup>70-72</sup>. Se han descrito cinco familias de PRRs: los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR), los receptores tipo proteína inducible por ácido retinoico (RIG-1), los receptores tipo lectina C (CLR) y los receptores tipo ausente en melanoma 2 (ALR)<sup>69</sup>.

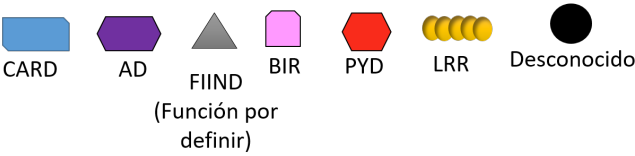
Los receptores NLR son receptores citoplasmáticos con un papel muy importante en la defensa inmune frente a un daño. Aunque se expresan principalmente en células inmunitarias, incluidos los linfocitos y las células presentadoras de antígenos, tales como macrófagos y células dendríticas, los NLR también se puede expresar en células no inmunes, incluidas las células epiteliales y mesoteliales. La familia de proteínas NLR tiene en común un dominio NOD central (también llamado NACHT), que participa en la actividad de la dNTPasa y en el proceso de oligomerización; un dominio efector N-terminal, que interactúa con otras proteínas y un dominio C-terminal, con repeticiones ricas en leucina (LRR), que está involucrado en la unión del ligando o en la detección del activador<sup>69,72</sup>. Actualmente hay al menos 22 miembros de esta familia perfectamente descritos en humanos (**Tabla 1**) y 34 en ratón<sup>73</sup>.

En función del dominio N-terminal, los NLR se pueden clasificar en cuatro subfamilias: la que contiene el dominio de transactivación ácida AD (NLRA), el dominio de repetición inhibitoria de baculovirus BIR (NLRB), el dominio de activación y reclutamiento de caspasas CARD (NLRC) y el dominio rico en pirinas PYD (NLRP)<sup>74</sup>. Una subfamilia adicional, llamada NLRX, no presenta una gran homología con el dominio N-terminal de cualquiera de los otros cuatro subconjuntos y actualmente consta de un solo miembro, *NLRX1* (*NOD9*) y que parece localizarse en las mitocondrias<sup>72</sup>, aunque en algunos artículos aparece clasificado dentro de la familia NLRC debido a su homología y relación filogenética<sup>69,73</sup>. En humanos, la subfamilia NLRA incluye solo un miembro, el transactivador *MHC-II* (*CIITA*); la subfamilia de NLRB consta de miembro bien definido, NAIP, si bien, recientemente se ha descrito una nueva isoforma de *NAIP*, *NAIP\**, que no ha sido todavía ampliamente estudiada pero que parece expresarse en macrófagos humanos tras la infección por *Salmonella*<sup>75</sup>; la subfamilia NLRC consta de seis miembros: *NLRC1* (*NOD1*), *NLRC2* (*NOD2*), *NLRC3*, *NLRC4*, *NLRC5* y la subfamilia NLRP consta de 14 miembros, *NLRP1-14*, si bien no ha observado ningún dominio tipo

LRR en *NLRP10*, lo que puede indicar que esta proteína como un adaptador de señalización en lugar de como un sensor NLR<sup>73</sup> (Tabla 1).

Tabla 1: Estructura y clasificación de los principales NLR humanos

Familia	Gen	Alias	Estructura
NLRA	CIITA	C2TAIV, MHC2TA,NLRA	
NLRB	NAIP	BIRC1, NLRB1, psiNAIP	
NLRC	NOD1	CARD4, CLR7.1, NLRC1	
	NLRC4	AIFEC, CARD12, CLAN, CLAN1, CLANA, CLANB, CLANC, CLAND, CLR2.1, FCAS4, IPAF	
	NOD2	ACUG, BLAU, BLAUS, CARD15, CD, CLR16.3, IBD1, NLRC2B, PSORAS1, YAOS	
	NLRC3	CLR16.2, NOD3	
	NLRC5	CLR16.1, NOD27, NOD4	
NLRP	NLRP1	AIADK, CARD7, CIDEA, CLR17.1, DEFCAP, DEFCAP-L/S, MSPC, NAC, NALP1, PP1044, SLEV1, VAMAS1	
	NLRP2	CLR19.9, NALP2, NBS1, PAN1, PYPAF2	
	NLRP3	AGTAVPRL, AII, AVP, C1orf7, CIAS1, CLR1.1, DFNA34, FCAS, FCAS1, FCU, KEFH, MWS, NALP3, PYPAF1	
	NLRP4	CLR19.5, CT58, NALP4, PAN2, PYPAF4, RNH2	
	NLRP5	CLR19.8, MATER, NALP5, PAN11, PYPAF8	
	NLRP6	AVR, CLR11.4, NALP6, NAVR, NAVR/AVR, PAN3, PYPAF5	
	NLRP7	CLR19.4, HYDM, NALP7, NOD12, PAN7, PYPAF3	
	NLRP8	CLR19.2, NALP8, NOD16, PAN4	
	NLRP9	CLR19.1, NALP9, NOD6, PAN12	
	NLRP11	CLR19.6, NALP11, NOD17, PAN10, PYPAF6, PYPAF7	
	NLRP12	CLR19.3, FCAS2, NALP12, PAN6, PYPAF7, RNO, RNO2	
	NLRP13	CLR19.7, NALP13, NOD14, PAN13	
	NLRP14	CLR11.2, GC-LRR, NALP14, NOD5, PAN8	
	NLRP10	CLR19.6, NALP11, NOD17, PAN10, PYPAF6, PYPAF7	
NLRX	NLRX1	CLR11.3, DLNB26, NOD26, NOD5, NOD9	



### 1.4.3. Descripción de los diferentes inflammasomas

Hasta la fecha se ha descrito ampliamente la capacidad de las proteínas AIM2, NLRP1, NLRP3 y NLRC4 para formar el complejo multiproteico del inflammasoma. Sin embargo, recientemente otras proteínas como NAIP, NLRP2, NLRP7, IFI16, NLRP12 y NLRP6, también pueden formar este complejo, si bien esta capacidad no ha sido tan extensamente caracterizada<sup>76,77</sup>. Un inflammasoma recientemente descrito y poco caracterizado es el de pirina, que cuenta con un dominio PYD y mutaciones en este dominio se han asociado con enfermedades autoinflamatorias y la dermatosis neutrofílica<sup>78</sup>.

El NLRP1 también conocido como NALP1, es el primer miembro de la familia de los NLR que se ha identificado que es capaz de formar el inflammasoma<sup>76</sup>. Está expresado en muchos tipos de células inmunocompetentes, en particular, las células de Langerhans de la piel<sup>79</sup>. Mutaciones en *NLRP1* se han asociado con la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes como el vitíligo y enfermedades inflamatorias<sup>80</sup>. También tiene un papel crucial en mediar la expresión de citocinas inflamatorias durante la infección con *Toxoplasma gondii*<sup>81</sup> y en enfermedades asociadas al sistema nervioso<sup>82</sup>.

De entre todos los inflammasomas, el compuesto por NLRP3 ha sido el más ampliamente investigado y caracterizado y parece tener un papel en un gran número de enfermedades humanas<sup>83</sup>. Se expresa principalmente en monocitos, macrófagos, granulocitos, células dendríticas, células epiteliales y osteoblastos. NLRP3 se ha asociado con diferentes enfermedades autoinflamatorias (síndromes periódicos asociados a criopirina), metabólicas y autoinmunes. En modelos experimentales en ratones, NLRP3 parece tener una función en la gota, diabetes tipo 2, obesidad, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedad renal, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedad ósea, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal, enfermedad de Alzheimer y envejecimiento<sup>76</sup>.

El inflammasoma de NLRC4 (también conocido como IPAF) se expresa altamente en el cerebro humano, la médula ósea y la línea celular monocítica humana THP-1. NLRC4 que tiene un papel en la infección por *Salmonella*. Estudios experimentales han revelado un papel de NLRC4 en la inflamación del tracto gastrointestinal y el cáncer de colon<sup>76</sup>.

Otro inflammasoma ampliamente descrito es el compuesto por el receptor de la proteína AIM2 (ALR). ALR es un receptor citosólico que se expresa en macrófagos y células dendríticas<sup>76,84</sup>. Tiene un papel fundamental en la defensa frente a un conjunto de patógenos bacterianos y su expresión desregulada en células humanas está asociada

con varias enfermedades. El aumento de la expresión de AIM2 se asocia con el desarrollo de psoriasis, aneurisma aórtico abdominal y lupus eritematoso sistémico; mientras que la expresión reducida de AIM2 está relacionada con el cáncer colorrectal y de próstata<sup>85,86</sup>.

#### 1.4.4. Regulación del inflamasoma

Los inflamasomas se activan en respuesta a señales extracelulares e intracelulares, tanto positivas como negativas, a distintos niveles, con la finalidad de asegurar una rápida y eficiente respuesta inflamatoria ante la presencia de un patógeno o un daño estéril.

I NLRP3 responde a una amplia gama de DAMPs y PAMPs, incluidos los ácidos nucleicos virales y bacterianos, patógenos intracelulares; ATP, ácido úrico, péptido  $\beta$ -amiloides, hialuronano y sulfato de heparina, sílice, amianto, colesterol y cristales de alumbre, metabolitos asociados con la diabetes tipo 2, como la ceramida, ácidos grasos saturados, péptidos amiloides de los islotes, hemozoína y nucleótidos cíclicos. Si bien, aunque NLRP3 responde a varios PAMPs y DAMPs, existe poca evidencia de su unión directa a cualquiera de estos ligandos. Por otra parte, la regulación post-transcripcional mediada por micro-ARNs controla la expresión de genes inflamatorios. En ese sentido, variaciones en los niveles de transcritos de NLRP3 regulan el umbral de respuesta de los inflamasomas en diferentes tipos celulares<sup>87</sup>.

Además de NLRP3, otros inflamasomas han servido de plataforma para el descubrimiento de diferentes formas de regulación. NLRP1 detecta la actividad proteolítica de la toxina letal del ántrax (LeTx) y del muramildipéptido (MDP) de micobacterias en presencia de ATP<sup>88-90</sup>. NLRC4 activa la caspasa-1 en respuesta a un dominio conservado de la proteína bacteriana flagelina, así como al componente conservado tipo varilla del sistema de secreción tipo III denominado PrgJ en *Salmonella* entérica serotipo *typhimurium*<sup>91,92</sup>. En algunos casos la activación de NLRC4 requiere de otros miembros NLR como NAIP5, en respuesta a diferentes patógenos como la *Legionella pneumophila*<sup>91</sup>. El inflamasoma AIM-2 parece reconocer el ADN doble cadena derivado de virus y de bacterias patógenas en el citoplasma de los macrófagos infectados por patógenos como *Francisella tularensis* o *Listeria monocytogenes*, a través de su receptor ALR<sup>78,84</sup>.

#### 1.4.5. Mecanismos de activación del inflamasoma

De entre todos los inflamasomas, el mecanismo de activación de NLRP3 ha sido el más estudiado. Se ha propuesto un modelo de dos señales para describir la activación

de NLRP3 en macrófagos en respuesta a numerosos estímulos. En este modelo, la primera señal (señal cebadora) es proporcionada por microbios o moléculas endógenas que inducen la expresión de NLRP3 y de pro-IL-1 $\beta$  a través de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B, mientras que la segunda señal (señal de activación) es desencadenada por ATP, toxinas formadoras de poros, ARN viral o materia particulada.

Los macrófagos, como los derivados de la médula ósea de ratón, muestran una activación nula o mínima del inflamasoma en respuesta a activadores de NLRP3, mientras que el tratamiento previo con ligandos microbianos aumenta mucho su activación<sup>93</sup>. Este tratamiento previo se define como el paso de cebado, que proporciona la primera señal para la activación del inflamasoma de NLRP3. A diferencia de la ASC y la caspasa-1, la cantidad de proteína NLRP3 existente en los macrófagos en condiciones de reposo es insuficiente para la activación del inflamasoma. Diferentes componentes microbianos, como ligandos de los TLR o moléculas endógenas como las citocinas factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) o IL-1 $\beta$  inducen la expresión de NLRP3 a través de la vía de NF- $\kappa$ B<sup>94</sup>. También la proteína asociada al dominio de muerte FAS (FADD) y la caspasa-8 aumentan la expresión de NLRP3 durante esta primera etapa<sup>95,96</sup>. Además, nuevos hallazgos indican que en esta etapa de cebado también se regula la activación de NLRP3 a nivel post-transcripcional, ya que sufre procesos de desubiquitinación<sup>97</sup>, siendo este proceso de activación más complejo de lo que se creía. Dada la diversidad química y estructural de los activadores de NLRP3, es poco probable que NLRP3 interactúe físicamente con sus activadores, por lo que es probable que NLRP3 detecte una señal celular común inducida en respuesta a estos activadores. Se han propuesto varios eventos moleculares y celulares como desencadenantes de la activación del inflamasoma, incluida la salida de K<sup>+</sup><sup>98</sup>, la señalización de Ca<sup>2+</sup><sup>99</sup>, las especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción mitocondrial y rotura lisosomal<sup>100</sup>. Sin embargo, el papel de estos eventos en la activación de NLRP3, salvo la salida de K<sup>+</sup>, no está del todo claro.

Recientemente se ha descrito en macrófagos un inflamasoma no clásico de NLRP3 activado por bacterias gram negativas y en el que la caspasa-11 causa la maduración y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 así como piroptosis<sup>101</sup>. Dado que este inflamasoma es activado en bacterias gram negativas, el LPS parece tener un papel clave, a través de TLR4, que permite detectar el LPS extracelular. El LPS puede unirse directamente a la caspasa-11 (o a las caspasas 4 o 5 humanas), promoviendo su activación y produciendo piroptosis. La piroptosis parece estar mediada por la Gasdermina D (GSDMD), que forma poros en la membrana, con la consecuente muerte celular<sup>67,102</sup> y que es activada por las caspasas-1 y 11 (4 y 5 humanas). Además, la caspasa-11 activada también puede producir piroptosis a través de la panexina-1 que se une al receptor P2X7<sup>103</sup>. También existe un inflamasoma alternativo de NLRP3 en monocitos humanos, que no requiere de la salida de K<sup>+</sup>, en el que participan las moléculas RIPK1, FADD y caspasa-8,

activando NLRP3 en respuesta a LPS. En esta vía alternativa no se ha evidenciado la existencia de piroptosis<sup>104</sup>.

#### 1.4.6. El inflamasoma en la enfermedad renal

Diferentes enfermedades humanas se han asociado a disfunción del inflamasoma, incluidas las enfermedades renales (**Tabla 2**). La activación del inflamasoma y la subsiguiente liberación de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 causa daño renal.

**Tabla 2:** Tabla resumen de los inflamasomas para los que se ha descrito una implicación en la enfermedad renal.

Inflamasoma	Enfermedad renal	Referencia
NLRP3	FRA experimental	Iyer S et al 2009 (Isquemia-Reperfusión) Cao Y et al 2015 (Sepsis) Komada T et al 2015 (Rabdomiolisis) Shen J et al 2016 (Contraste iodado) Mulay SR et al 2013 (cristales oxalato)
	ERC experimental	Babelova A et al 2009 (UUO) Vilaysane A et al 2010 (UUO) Komada T et al 2014 (UUO) Guo H et al 2017 (UUO) Chi H et al 2017 (UUO)
	ERC humana	Granata S et al 2015
	Nefropatía diabética experimental y humana	Shahzad K et al 2015 (Diabetes tipo 2) Mirza RE et al 2014 (Diabetes tipo 2)
	Glomerulonefritis experimental	Andersen K et al 2014 (NTN) Zhao J et al 2013 (Nefritis lúpica) Tsai Y et al 2013 (Nefropatía por IgA) Liu G et al 2015 (GEFS)
NLRP1	Glomerulonefritis Humana	Pontillo A et al 2012 (Nefritis lúpica)
AIM2	Glomerulonefritis Humana	Zhang W et al 2013 (Nefritis lúpica)
NLRP4	Nefropatía diabética experimental y humana	Yuan F et al 2016 (Diabetes tipo 2)

La interacción de IL-1 $\beta$  con su receptor (IL-1R) aumenta la producción de mediadores pro-fibróticos e inflamatorios como IL-6, TNF $\alpha$ , prostaglandinas, TGF- $\beta$ 1 y metaloproteinasas de matriz tisular (MMP), que son altamente relevantes para una gran variedad de enfermedades renales. Estudios experimentales con ratones deficientes para *Il-1r* resaltan el importante papel de IL-1 $\beta$  en el reclutamiento de células inflamatorias al riñón, promoviendo la producción de citocinas inflamatorias<sup>105</sup>. La IL-1 $\beta$  también desempeña un papel en la inmunidad adaptativa, modulando la diferenciación de células Th17<sup>106</sup> y tiene efectos directamente lesivos sobre las células renales<sup>107</sup>. IL-1 $\beta$  también estimula la liberación de la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) que es un biomarcador de lesión renal en células tubulares proximales y del túbulo colector<sup>108,109</sup>. Las MMP son secretadas por células renales en respuesta a citocinas e IL-1 $\beta$  contribuye a la lesión tisular inducida por MMP en células



mesangiales<sup>110</sup>. Las células mesangiales humanas tratadas con IL-1 $\beta$  acumulan ésteres de colesterol, que conducen a la producción de ROS y estrés del retículo endoplasmático<sup>111</sup>. La IL-1 $\beta$  también puede provocar disfunción podocitaria, afectando adversamente a la producción de proteínas claves del podocito como la nefrina<sup>112</sup>, lo que compromete su integridad y la de la barrera de filtración glomerular<sup>113</sup>.

La IL-18 es otra de las citocinas proinflamatorias liberadas tras la activación del inflamasoma. La IL-18 se une a su receptor específico (IL-18R), activando una cascada de señalización que incluye la activación de NF- $\kappa$ B y de la MAPK p38, con la consecuente producción de citocinas proinflamatorias<sup>114,115</sup>. IL-18 parece ser particularmente importante en la activación y reclutamiento de neutrófilos en el riñón y como consecuencia, puede liberar citocinas, quimiocinas y ROS<sup>116</sup>. Además, IL-18 también promueve la producción de citocinas proinflamatorias por células mesangiales<sup>117</sup>. La IL-18 tiene también un papel pro-fibrótico<sup>118,119</sup>. Varios estudios han mostrado que la IL-18 activa las vías de STAT-3<sup>120</sup> y TLR4<sup>121</sup> en células tubulares renales, lo que tiene consecuencias profibróticas. IL-18 también favorece la apoptosis de las células tubulares durante el daño renal, a través de un mecanismo FasL-dependiente<sup>122</sup>.

La necrosis tubular aguda (NTA) es la característica histológica más común de las diferentes formas del FRA. Si bien NTA es un término que precede a las diferentes formas de muerte celular, ha resultado ser bastante acertado, dado el papel clave que estudios recientes sugieren para la necrosis programada en el FRA. Las células tubulares necróticas dañadas liberan DAMPs que activan a los PRRs e inician respuestas inmunes innatas frente al daño renal. Existen numerosos estudios que demuestran que el inflamasoma de NLRP3 tiene un papel en el FRA. Este papel se ha observado en diferentes modelos experimentales de FRA, donde se ha demostrado que ratones deficientes para *Nlrp3* están protegidos frente al FRA inducido por isquemia-reperfusión<sup>123</sup>, el FRA inducido por sepsis<sup>124</sup>, el FRA asociado a la rabiomiolisis<sup>125</sup>, el inducido por medios de contraste iodados<sup>126</sup> y el FRA causado por depósito de cristales de oxalato<sup>127</sup>.

El modelo experimental de obstrucción uretral unilateral (UUO) en roedores ha sido ampliamente empleado para estudiar la progresión de la ERC y los mecanismos de fibrosis renal asociados. Diversos estudios han empleado este modelo para investigar el papel del inflamasoma en la ERC. El biglicano, un componente de la matriz extracelular y un ligando endógeno para TLR4 y TLR2, actúa como un DAMP para la activación del inflamasoma de NLRP3 en el UUO, iniciando la maduración de la caspasa-1 y la secreción de IL-1 $\beta$ <sup>128</sup>. En este sentido, los ratones deficientes para *Nlrp3* y *Asc* se vio que desarrollan una menor lesión tubular, inflamación y fibrosis tras el UUO<sup>129,130</sup>. Existen estudios que sugieren que el inflamasoma de NLRP3 promueve la

fibrosis renal a través de la promoción de la disfunción mitocondrial y la posterior liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18<sup>131</sup> y mediante la señalización de IL-36 tanto en las células inmunitarias como en el epitelio renal<sup>132</sup>. Se ha visto a nivel experimental que el factor de crecimiento 8 del glóbulo de grasa de leche (MFGE8), para el cual se había descrito anteriormente un papel antiinflamatorio, atenúa la fibrosis e inflamación renal tras el UUU a través de la inhibición de la activación del inflamasoma de NLRP3<sup>133</sup>, corroborando el papel de la activación del inflamasoma de NLRP3 en la progresión de la fibrosis durante la ERC. Además de a nivel experimental, el inflamasoma de NLRP3 también parece tener un papel durante la ERC humana. Se ha visto un aumento de los niveles de ARNm y proteína de NLRP3 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con ERC dializados, en comparación con pacientes sanos, empleados como control<sup>134</sup>.

I La nefropatía diabética, es la causa principal de enfermedad renal en estadio terminal<sup>135</sup>. El inflamasoma de NLRP3 podría contribuir también a la nefropatía diabética. De hecho, las concentraciones altas de glucosa características de la diabetes estimulan la expresión de NLRP3<sup>136</sup>. En un modelo experimental de diabetes tipo 2, los ratones deficientes en caspasa-1 y *Nlrp3* estaban protegidos de la nefropatía y también hay evidencia indirecta del papel del inflamasoma en pacientes con nefropatía diabética<sup>137</sup>. Las ROS mitocondriales podrían activar el inflamasoma de NLRP3 en la nefropatía diabética, como sugieren estudios *ex vivo* en monocitos humanos y macrófagos y en ratones diabéticos tipo 2 tratados con inhibidores de ROS mitocondriales<sup>137,138</sup>.

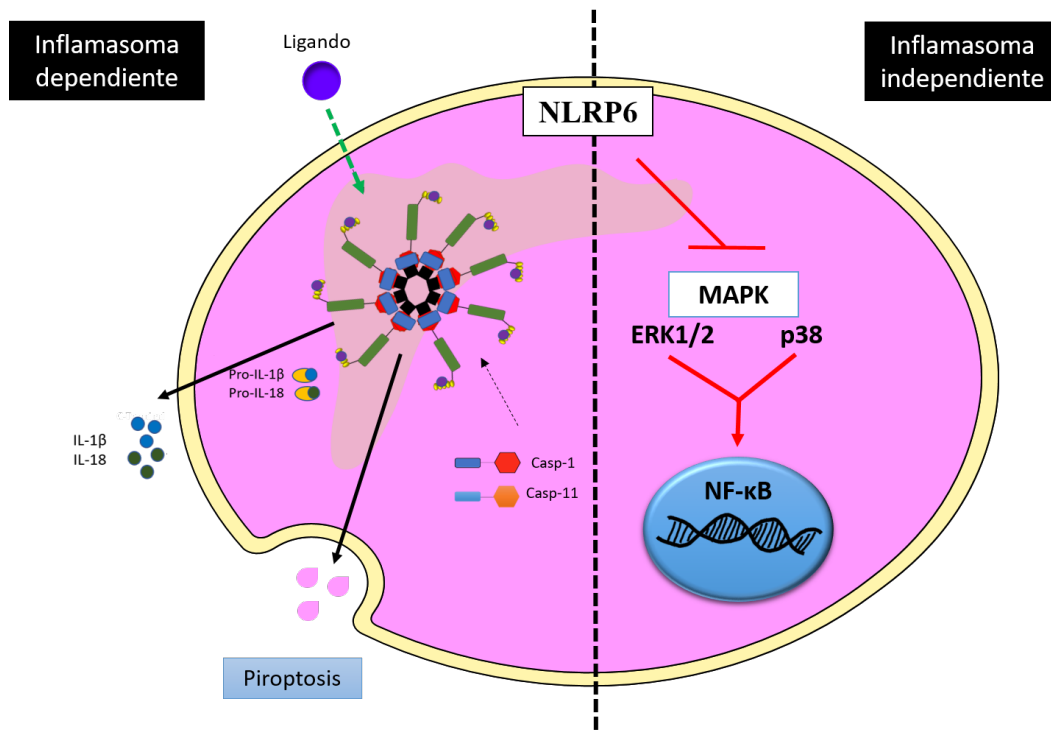
La autoinmunidad subyace a la mayoría de las formas de glomerulonefritis<sup>139</sup>. Aunque son parte del sistema inmune innato, los inflamasomas pueden modular respuestas inmunes adaptativas, lo que contribuye a la pérdida de tolerancia y autoinmunidad, a través de los efectos sobre la diferenciación de células T. Se ha descrito una posible participación del inflamasoma de NLRP3 en diferentes modelos experimentales de glomerulonefritis. En un modelo experimental de nefritis nefrotóxica (NTN) los ratones deficientes para *Nlrp3* y para otros componentes del inflamasoma como *Asc*, quedaron protegidos del daño renal, de la activación de células T y de la infiltración de leucocitos<sup>140</sup>. También se ha descrito una participación del inflamasoma de NLRP3 durante la progresión de la nefritis lúpica experimental. El tratamiento con Bay11-7082, que ha sido identificado como un inhibidor de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y de la subsiguiente activación de NF- $\kappa$ B, previno no sólo la activación de la activación NF- $\kappa$ B, sino también la activación del inflamasoma de NLRP3 en la nefritis lúpica y disminuyó la proteinuria, la urea en sangre y el daño glomerular, y la expresión de citocinas proinflamatorias y el infiltrado de macrófagos<sup>141</sup>. Estos resultados sugieren un papel dual de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B y del inflamasoma de NLRP3 en la patogenia de la nefritis lúpica. El inflamasoma de NLRP3 podría

contribuir también a la nefropatía por inmunoglobulina A (IgA), caracterizada por la acumulación de IgA en los glomérulos, produciendo inflamación y defectos en la capacidad de filtración. En un estudio experimental se observó un aumento de los componentes del inflamasoma de NLRP3 como NLRP3, IL-18 y caspasa-1. La deficiencia de *Nlrp3* en ratones disminuyó la deposición de IgA y mejoró la función renal<sup>142</sup>. La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) es una morfología inespecífica que implica pérdida de podocitos y evolución a fibrosis glomerular. En la GEFS inducida por adriamicina en ratones, la supresión del inflamasoma de NLRP3 mediante astaxantina tuvo un efecto nefroprotector<sup>143</sup>.

Además de NLRP3, que es el inflamasoma más estudiado, también se ha implicado a otros inflamasomas en la enfermedad renal. Los polimorfismos en *NLRP1* se asocian con el desarrollo de nefritis lúpica en humanos<sup>144</sup>. El inflamasoma de AIM2, al igual que el de NLRP3, también aumenta durante la nefritis lúpica. En células mononucleares de sangre periférica de pacientes con nefritis lúpica se observó un aumento de los niveles de AIM2 en comparación con los controles y los niveles de AIM2 se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad. Además, en un modelo experimental murino de nefritis lúpica inducido por la inmunización con ADN apoptótico derivado de linfocitos, se observó que el silenciamiento de *Aim2* mediante siARNs específicos tanto *in vivo* como *in vitro*, disminuyó la gravedad de la nefritis lúpica, la infiltración de macrófagos y la expresión de citocinas proinflamatorias<sup>145</sup>. Los niveles de la proteína NLRC4 están aumentados en los túbulos renales de pacientes diabéticos tipo 2 y los ratones deficientes para *Nlrc4* estuvieron protegidos de la diabetes tipo 1 por estreptozotocina y de la lesión renal asociada, teniendo menor hipertrofia glomerular, expansión mesangial, engrosamiento de la membrana basal e inflamación<sup>146</sup>.

#### 1.4.7. NLRP6

“NOD-Like Receptor family Pyrin domain-containing 6” (NLRP6) es un miembro recientemente descrito y poco caracterizado de la familia de los NLR, en concreto de la subfamilia de los NLRP, que se define por tener un dominio N-terminal tipo PYD, rico en pirina<sup>147</sup>. NLRP6 es el único NLR conocido que es capaz de formar el inflamasoma clásico, el inflamasoma no clásico y de regular negativamente vías de señalización intracelular inflamatorias como las vías de NF-κB y de las MAPK, que median la producción de citocinas y quimiocinas<sup>148</sup> (**Figura 4**).



**Figura 4:** Figura representativa de las posibles vías de activación de NLRP6. Inflammasoma-dependiente (izquierda) e Inflammasoma-independiente (MAPK y NF- $\kappa$ B) (derecha).

*Nlrp6* se encuentra altamente expresado a nivel de ARNm en el intestino grueso, delgado, en el hígado, en el pulmón y en el riñón, entre otros<sup>147,149,150</sup>. Las funciones de NLRP6 han sido estudiadas fundamentalmente en el tracto gastrointestinal donde se expresa en células intestinales específicas como los enterocitos y las células caliciformes<sup>149,151,152</sup>. El tracto gastrointestinal tiene la peculiaridad de que el epitelio está en contacto directo con trillones de microorganismos comensales que colonizan el intestino y que constituyen la microbiota, que está formada fundamentalmente por bacterias, aunque en ella también coexisten virus y microorganismos eucariotas<sup>149</sup>. Desde el nacimiento, el sistema inmune convive con la microbiota, adquiriendo la capacidad de tolerar componentes de la comunidad microbiana intrínseca, mientras mantiene la capacidad de responder a los patógenos invasores. La colonización microbiana del intestino en la infancia se asocia a un aumento de los componentes del inflammasoma de NLRP6 y de las citocinas producidas tras su activación como IL-18, lo que sugiere un papel de la microbiota en la inducción de la respuesta antimicrobiana frente a los patógenos, dependiente de NLRP6<sup>153,154</sup>.

En cuanto a su regulación, un análisis metabólico no sesgado, identificó recientemente el derivado de ácido biliar, la taurina, como un metabolito modulado por la microbiota que regula positivamente la señalización NLRP6 y la producción de IL-18<sup>153</sup> (**Tabla 3**). Por el contrario, otros metabolitos microbianos como la poliamina espermina y el aminoácido histamina, disminuyen la actividad del inflammasoma de NLRP6 en los enterocitos<sup>153</sup>. Los niveles de NLRP6 también están aumentados tras la

exposición a LPS, componente de la pared de las bacterias gram negativas<sup>155</sup>. Además, recientemente se ha visto que el ácido lipoteicoico (LTA), uno de los principales componentes de la pared celular de las bacterias gram positivas, se une y activa NLRP6, a través del inflamasoma no clásico mediado por la caspasa-11<sup>156</sup>. La expresión de NLRP6 también está regulada por mecanismos no microbianos, como la hormona liberadora de corticotropina inducida por estrés (CRH), que en un modelo experimental de estrés inducido por la privación de agua, disminuyó la expresión de los componentes del inflamasoma de NLRP6, como ASC, IL-18, IL-1 $\beta$  y caspasa-1 en las células epiteliales intestinales (enterocitos), lo que alteró la permeabilidad intestinal<sup>157</sup>. La región promotora *Nlrp6* alberga sitios de unión para el receptor del proliferador activado del peroxisoma gamma (PPAR $\gamma$ ) y para el receptor retinoide X (RXR)<sup>154</sup>. *In vivo*, la respuesta inflamatoria inducida por estrés fue inhibida por la administración de un agonista de PPAR $\gamma$ , la rosiglitazona, que *in vitro* aumentó la expresión del inflamasoma de NLRP6 en las células epiteliales intestinales humanas<sup>154,157</sup>. Además, se ha visto que la flavona apigenina, presente en muchos productos alimenticios derivados de plantas, tiene un papel protector durante la colitis experimental. Se ha descrito que la apigenina lleva a cabo acciones antiinflamatorias y antiproliferativas en las células epiteliales intestinales al activar NLRP6 y modular la composición de la microbiota intestinal, de manera inflamasoma-independiente<sup>158</sup>.

**Tabla 3: Factores que regulan NLRP6.**

<b>Factor regulador</b>	<b>↑ NLRP6</b>	<b>↓ NLRP6</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Referencia</b>
<b>Taurina</b>	X		Enterocitos murinos (Inflamasoma-dependiente)	Levy et al 2015
<b>Histamina</b>		X	Enterocitos murinos (Inflamasoma-dependiente)	Levy et al 2015
<b>Espermina</b>		X	Enterocitos murinos (Inflamasoma-dependiente)	Levy et al 2015
<b>LPS</b>	X		Células hepáticas humanas (Inflamasoma-dependiente)	Lee HJ et al 2015
<b>LTA</b>	X		Macrófagos murinos (Inflamasoma-dependiente)	Hara H et al 2018
<b>CRH</b>		X	Enterocitos murinos (Inflamasoma-dependiente)	Sun Y et al 2013
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	X		Enterocitos humanos (Inflamasoma-dependiente)	Kempster et al 2011 Sun Y et al 2013
<b>Apigenina</b>	X		Enterocitos humanos (Inflamasoma-independiente)	Radulovic K et al 2018

Diversos estudios muestran que NLRP6 tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En estudios experimentales, NLRP6 protege a los ratones contra la colitis inducida químicamente por el Dextrano Sulfato de Sodio (DSS) y de la tumorigénesis asociada a la misma, al combinar el DSS con el Azoximetano (AOM)<sup>147</sup>. Los ratones deficientes para *Nlrp6* y para otros componentes

de inflamasoma como *Asc*, son incapaces de resolver la inflamación y de reparar el epitelio tras el daño<sup>149</sup> y en concreto, el NLRP6 expresado por las células hematopoyéticas, parece ser clave en este proceso<sup>147</sup>. Recientemente se demostró que la colitis espontánea o química de los ratones deficientes para *Nlrp6* depende de la quimiocina proinflamatoria CCL5, que promueve la proliferación de células epiteliales a través de la activación local de la vía de IL-6, lo que lleva al desarrollo de cáncer<sup>159</sup>. La IL-10 es una citocina antiinflamatoria y se ha observado que defectos en la misma, conducen al desarrollo de colitis. Un estudio reciente ha demostrado que NLRP6 también protege a los ratones deficientes para *Il-10* de la colitis<sup>160</sup>.

Las células epiteliales intestinales controlan la colonización microbiana a través de varios mecanismos, entre ellos, la secreción de mucus. La capa de mucus intestinal es una barrera primaria de defensa contra la invasión de patógenos y protege al epitelio del daño físico. Las células caliciformes generan gránulos de mucina, que son secretados al lumen intestinal, para formar la capa de mucus<sup>161</sup>. La glicoproteína secretora Mucina-2 (MUC-2) es el principal componente de la capa de mucina y los ratones deficientes para *Muc-2* muestran una pérdida de la capa interna de mucus y la consiguiente translocación bacteriana al epitelio intestinal, lo que favorece la inflamación y la carcinogénesis<sup>162</sup>. NLRP6 regula la secreción de mucus por parte de las células caliciformes. Los ratones deficientes para *Nlrp6* presentan una deficiencia en exocitosis de los gránulos de mucina, lo que se asocia con defectos en la autofagia, al igual que los ratones deficientes en otros componentes del inflamasoma como *Asc* o caspasa-1 y caspasa-11, indicando que es un proceso dependiente de la formación del inflamasoma de NLRP6. Sin embargo, se ha visto que la disminución de la expresión de IL-18 e IL-1 $\beta$  no afecta a la integridad de la capa de mucus<sup>152</sup>. La pérdida de la capa de mucus como consecuencia de la deficiencia de *Nlrp6* hace que estos ratones sean más susceptibles a la infección por patógenos<sup>152</sup>. Además, un estudio reciente reveló la existencia de células caliciformes “centinelas” en las criptas intestinales superiores, sensibles a TLRs que, ante una invasión bacteriana, desencadenan la exocitosis de la mucina MUC-2 e inducen la secreción de MUC-2 por parte de las células caliciformes adyacentes de manera calcio-dependiente, protegiendo de los intrusos bacterianos que han penetrado la capa interna de mucus<sup>163</sup>. Además de la barrera mucosa, las células epiteliales regulan la colonización microbiana a través de la secreción de péptidos antimicrobianos (AMPs), incluidos los miembros de la familia de las defensinas, las catelicidinas y angiogeninas<sup>164,165</sup>. La formación del inflamasoma de NLRP6 en respuesta a la microbiota promueve la liberación de IL-18, que, a su vez, actúa de forma autocrina en el epitelio para promover la transcripción de péptidos antimicrobianos como angiogenina-4, intelectina-1, resistina y otros<sup>153</sup>, por lo que el papel de NLRP6 en la defensa microbiana a través de la liberación de AMPs es dependiente del inflamasoma. Además, la IL-18 liberada por las células intestinales en respuesta a la activación del inflamasoma de NLRP6 también induce AMPs a través de

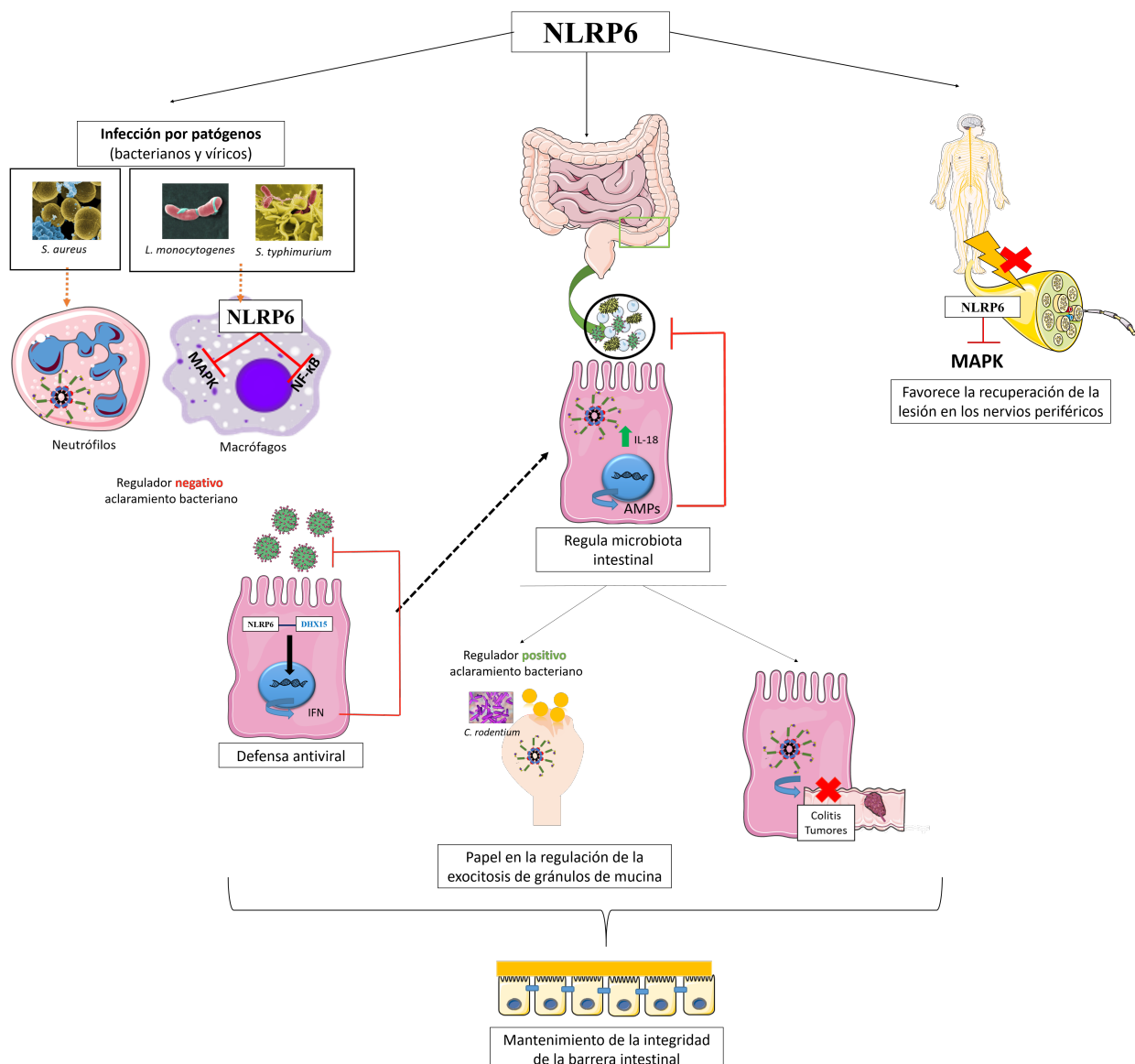
un mecanismo indirecto. La IL-18 disminuye la expresión de la proteína de unión a IL-22 (IL-22BP) en las células mieloides intestinales, lo que aumenta los niveles de IL-22 bioactivo, que es un potente inductor de la respuesta antimicrobiana epitelial<sup>166</sup>. El IL-22, a su vez, induce la expresión de IL-18<sup>167</sup>. A través de estos mecanismos, la disrupción de la vía de señalización de NLRP6 en el epitelio intestinal, conducen a una disbiosis, a una alteración en la microbiota, que se caracteriza por la presencia de las especies *Prevotellaceae* y *Helicobacteriaceae*, entre otras<sup>149</sup>. Una característica notable de los ratones deficientes en *Nlrp6* es su capacidad para transferir y establecer disbiosis en ratones WT<sup>149,153,168</sup>. Los ratones WT que cohabitaban con ratones deficientes para *Nlrp6*, adquirían una microbiota disbiótica. En un estudio experimental, la deficiencia de *Nlrp6* agravó la esteatosis hepática y la obesidad como consecuencia de dicha disbiosis<sup>169</sup>. Sin embargo, el papel de NLRP6 en la regulación de la microbiota intestinal ha sido cuestionado. En 2017 se publicó que al estudiar ratones hermanos de camada, NLRP6 no parece modular la composición o diversidad de la microbiota intestinal. Además, la gravedad de la colitis fue similar en ratones deficientes para *Nlrp6* y en sus hermanos de camada WT, excepto en el caso de las hembras deficientes en *Nlrp6* que mostraron un aumento moderado en la sensibilidad en comparación con las hembras WT<sup>170</sup>.

Además de en las células epiteliales del tracto gastrointestinal, recientemente se demostró que NLRP6 se expresa en monocitos inflamatorios intestinales Ly6C<sup>hi</sup> y en neutrófilos tras la inducción química de la colitis y que NLRP6 tiene un papel en la defensa frente a patógenos. Los monocitos de los ratones deficientes para *Nlrp6*, presentaban una menor capacidad bactericida, con una menor producción de ROS y TNF $\alpha$ . La inyección de monocitos Ly6C<sup>hi</sup> de ratones WT a ratones deficientes para *Nlrp6*, aumentó la protección contra la colitis, redujo la permeabilidad de la barrera intestinal y la translocación bacteriana y aumentó la supervivencia de los ratones<sup>171</sup>. Además, en células mieloides se había descrito que NLRP6 regula la vía canónica de NF- $\kappa$ B y las MAPK<sup>172</sup>. Los ratones deficientes para *Nlrp6* mostraban una mayor activación de estas dos vías de manera TLR-dependiente, por lo que los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones deficientes en *Nlrp6* infectados por patógenos bacterianos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*, produjeron mayor cantidad de citocinas y quimiocinas dependientes de estas vías, lo que contribuyó a un mayor aclaramiento bacteriano<sup>172</sup>. También se ha descrito un papel perjudicial de NLRP6 en la defensa frente a *Staphylococcus aureus*, donde se vio como tras la infección se producía un aumento de los niveles de expresión de NLRP6 y de componentes del inflamasoma como ASC y caspasa-1 en macrófagos, neutrófilos y células epiteliales del pulmón. La deficiencia de *Nlrp6* produce una disminución de la actividad bactericida de los neutrófilos, con una menor respuesta inflamatoria y una menor muerte celular<sup>173</sup>. Sin embargo, esta respuesta depende del tipo de bacteria, ya que se ha visto que la activación del inflamasoma de NLRP6 protegió frente a la



infección por otras bacterias como *Citrobacter rodentium*, mediante la regulación de la función de células caliciformes<sup>152</sup>.

Por lo tanto, NLRP6 tiene funciones diferentes que dependen del tipo celular y del contexto específico (**Figura 5**). De hecho, NLRP6 es muy versátil y tiene funciones en diferentes tipos celulares. Recientemente se ha descrito que NLRP6 favorece a la recuperación de la lesión de nervios periféricos, de manera independiente de la activación del inflammasoma a través de la regulación negativa de la activación de la vía de las MAPK<sup>174</sup>.



**Figura 5: Funciones descritas de NLRP6 en los diferentes tipos celulares y vías implicadas.**



Aparte de su papel en la defensa bacteriana, NLRP6 tiene un papel en la infección intestinal por virus. Tras la infección por el virus de ARN de la encefalomiocarditis (ECMV), se ha visto que en las células epiteliales intestinales NLRP6 se une al ARN viral a través de la helicasa DHX15, regulando la expresión de un gran número de genes estimulados por Interferones (IFNs) que son críticos para la inmunidad antiviral, a través de la proteína adaptadora mitocondrial de señalización antiviral (MAVS). Esta función no requiere caspasa-1, sugiriendo un mecanismo inflammasoma-independiente. Así, la infección viral y los IFNs de tipo I inducen la expresión de NLRP6. Por consiguiente, los ratones deficientes en *Nlrp6* son más susceptibles a la infección entérica con virus de ARN. Sin embargo, la ausencia de *Nlrp6* no modificó la mortalidad tras la infección sistémica con estos virus<sup>175</sup>.

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la expresión y función de NLRP6 se derivan de estudios en ratones genéticamente modificados y los datos sobre la actividad de NLRP6 en humanos siguen siendo limitados. Se encontraron niveles elevados de NLRP6 y de IL-18 en el tejido adiposo de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y fibrosis hepática<sup>176</sup>. Pese a los hallazgos obtenidos en modelos animales, mediante estudios de transcriptómica, no se observaron cambios en los niveles de expresión de NLRP6 en muestras humanas de cáncer colorrectal, en comparación con los individuos sanos<sup>177</sup>. Tampoco se observaron cambios en los niveles de ARNm de *NLRP6* en células polimorfonucleares procedentes de pacientes con VIH, en comparación con individuos sanos<sup>178</sup>. También se ha descrito una posible implicación de NLRP6 en la función plaquetaria. En un estudio de asociación de genoma completo (GWAS), se ha visto como polimorfismos en *NLRP6*, dan lugar a alteraciones en el proceso de megacariopoyesis<sup>179</sup>.

Si bien, se sabe que NLRP6 está expresado en el riñón, su función en el mismo no ha sido descrita y en esto nos centraremos en el desarrollo de esta tesis doctoral.

## 1.5. El factor de transcripción NF-κB

El factor nuclear-kappa B (NF-κB) es una familia de factores de transcripción pleiotrópicos, que controlan e integran una red de vías de señalización y estímulos extracelulares, que resulta en la regulación transcripcional de cientos de genes relacionados con la inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación y diferenciación celular<sup>180–183</sup>. La desregulación de NF-κB se ha relacionado con diversas patologías como el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes<sup>184</sup>. NF-κB es un homodímero o heterodímero, que en mamíferos consta de cinco miembros: RelA/p65, RelB, c-Rel, NF-κB1 p50, que se genera a partir de p105, y NF-κB2 p52, que se genera a partir de p100<sup>183,185</sup>. Todos comparten en su región N-terminal un dominio altamente

conservado, denominado dominio de homología rel (DHR), responsable de la unión al ADN, de la dimerización y de la interacción con los miembros de la familia proteínas inhibitorias IκB. RelA, c-Rel y RelB contienen un dominio de transactivación C-terminal con múltiples repeticiones de anquirina. Para activar la transcripción, forman dímeros con p50 o p52. La activación de NF-κB no requiere la síntesis *de novo* de proteínas NF-κB, ya que están presentes como un complejo inactivo en el citoplasma. El dímero más abundante en la mayoría de los tipos celulares y por tanto el mejor caracterizado es el formado por RelA/p50. La actividad de NF-κB está regulada por su interacción con las proteínas IκB inhibitorias. Las proteínas IκB incluyen IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, IκBz y Bcl-3, siendo la primera la más estudiada<sup>181,182,186</sup>. NF-κB1 y NF-κB2 se sintetizan como precursores, p105 y p100, respectivamente. Las IκB contienen entre cinco y siete repeticiones conservadas de tipo anquirina, fundamentales para su unión a NF-κB a través de los dominios DHR. El procesamiento proteasomal da como resultado la degradación de las repeticiones de anquirina C-terminales, que interrumpe la función de tipo IκB y genera las subunidades activas p50 y p52 de NF-κB<sup>187,188</sup>. La vía de NF-κB es activada por un gran número de estímulos, incluyendo citocinas y factores de crecimiento, DAMPs, PAMPs, TLRs, NLRs, compuestos genotóxicos, niveles altos de glucosa, productos finales de glicosilación avanzada, mediadores inmunes y la proteinuria, entre otros<sup>52</sup>. Además de la gran variedad de estímulos que la activan, la vía de NF-κB está controlada también por modificaciones postraduccionales, sobre todo por la fosforilación o acetilación de proteínas Rel, por co-activadores y co-represores de la transcripción y por la acetilación del ADN que modula la unión del ADN, la interacción con co-represores o co-activadores y la inducción o represión de la transcripción. Hasta la fecha, se han identificado nueve sitios de fosforilación en p65<sup>180,181,189,190</sup>.

### 1.5.1. Activación de NF-κB

La activación de la vía de NF-κB puede tener lugar por la vía canónica (o clásica), por la vía no-canónica (o alternativa) o por una vía híbrida entre las dos anteriores<sup>125,199–201</sup>.

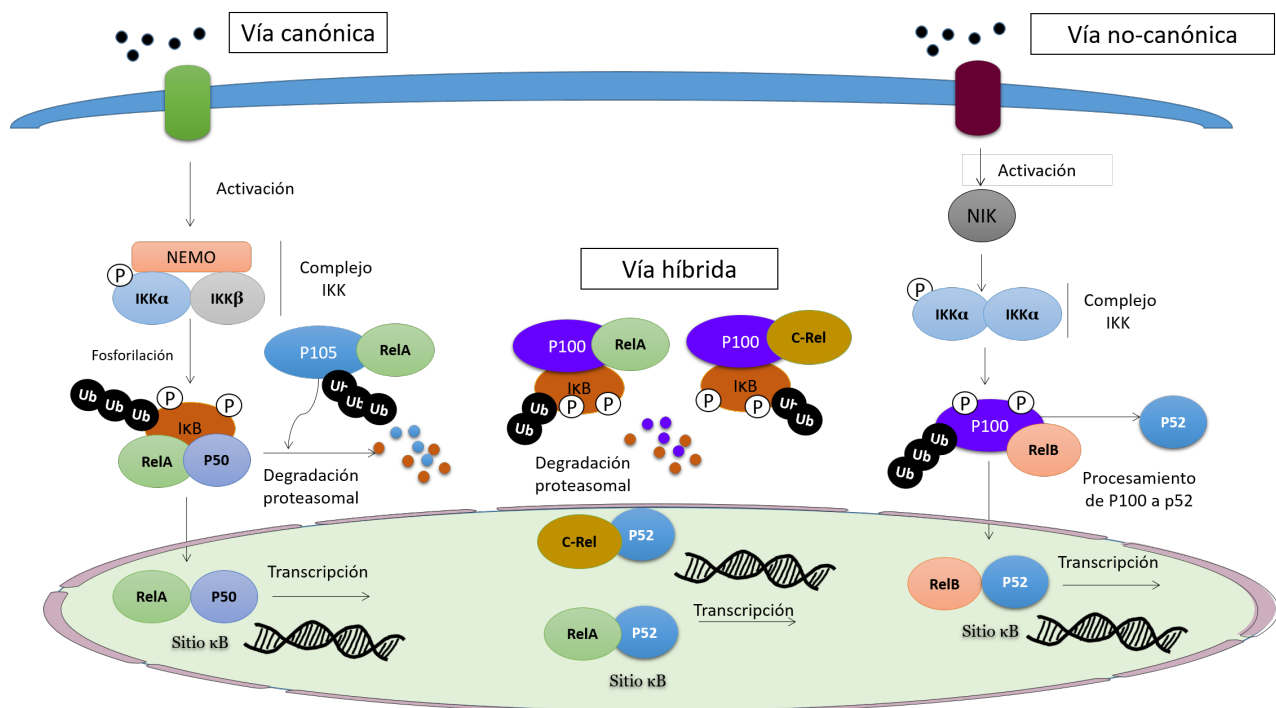
#### 1.5.1.1. Activación de la vía canónica de NF-κB

La activación de la vía canónica de NF-κB suele ser una respuesta rápida y transitoria a una amplia gama de estímulos, entre los que se encuentran TNFα, TWEAK, TCR, BCR, TLRs, LPS, IL-1R, factores de crecimiento, LDL oxidada, estímulos inmunológicos y el estrés físico o químico, entre otros<sup>194–197</sup>. Los estímulos activadores convergen en la activación de las quinasas IKK, que se compone de dos subunidades catalíticas, IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) y una subunidad reguladora, IKKγ (NEMO)<sup>72,181,182,198,199</sup>. El

complejo IKK fosforila I $\kappa$ B en dos serinas, lo que recluta la ubiquitina ligasa, marcándola para la degradación a través del proteasoma 26S. También se produce el procesamiento proteasomal de p105 a p50 y como consecuencia de esto se libera el dímero RelA/P50, que se transloca al núcleo donde se une a los sitios- $\kappa$ B de los genes diana, activando o reprimiendo su expresión<sup>52,200</sup> (**Figura 6**). La activación canónica de NF- $\kappa$ B regula la transcripción de genes que codifican múltiples proteínas pro-inflamatorias como las quimiocinas MCP-1 y RANTES, la molécula de adhesión ICAM-1 o el gen antiinflamatorio Klotho<sup>184,201,202</sup>.

### 1.5.1.2. Activación de la vía no-canónica de NF- $\kappa$ B

La vía no-canónica es una vía más lenta y prolongada en el tiempo que la canónica<sup>52</sup>. A diferencia de la anterior, existe un número limitado de estímulos que la activan como CD40L, CD70, linfotóxina- $\beta$ , BAFF, RANKL y sobre todo el más estudiado a nivel renal, la citocina proinflamatoria TWEAK<sup>52</sup>. Esta ruta requiere la activación de la quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) que activa a IKK $\alpha$ <sup>188,203</sup>. Como consecuencia, IKK $\alpha$  fosforila a p100, promoviendo su poliubiquitinación y procesamiento proteasomal a la subunidad p52. Esto permite que el heterodímero RelB/p52 se traslade al núcleo y active la transcripción de genes diana<sup>204,205</sup> (**Figura 6**). Entre las dianas de esta vía destacamos, CCL19, CCL21 y CXCL10, entre otros<sup>31,52</sup>.



**Figura 6: Activación de la vía de NF- $\kappa$ B.**

La vía híbrida requiere la contribución de ambas vías: la no-canónica genera el complejo y la canónica, activa el complejo<sup>204</sup>. p100 puede estar también en el citoplasma formando heterodímeros con RelA y c-Rel. En este caso al procesarse p100 quedarían los heterodímeros p52/RelA o p52/c-Rel que pueden quedar retenidos en el citoplasma por las subunidades inhibitorias IκB (principalmente IκBα e IκBβ), cuya degradación es inducida a través de la activación del complejo IKK<sup>204,206</sup> (**Figura 6**).

### 1.5.2. Activación de NF-κB en células renales

La activación de NF-κB se ha descrito en células renales intrínsecas como los podocitos, células mesangiales, tubulares y endoteliales en la lesión renal o tras la exposición a estímulos inflamatorios. Muchos estímulos activan *in vitro* la vía canónica de NF-κB en células renales para regular la transcripción de múltiples moléculas proinflamatorias<sup>199</sup>. Las citocinas de la superfamilia del TNF y la angiotensina II (AngII) son activadores clave de la vía de NF-κB en la enfermedad renal<sup>207,208</sup>. TWEAK y TNFα activan genes inflamatorios en células tubulares<sup>57</sup>. En células tubulares cultivadas, TWEAK promueve la activación temprana de la vía canónica y una activación prolongada y más tardía de la vía no-canónica de NF-κB<sup>52,188</sup>. En estas células tubulares, TWEAK y TNFα inducen la producción de las citocinas MCP-1 y RANTES, dianas de la vía canónica de NF-κB, pero sólo TWEAK induce la expresión de CCL21 y CCL19 que son dianas de la vía no-canónica de NF-κB. TWEAK también activó la vía no-canónica en el riñón *in vivo*<sup>209</sup>. NF-κB también modula la respuesta inflamatoria durante la lesión renal más allá del aumento de expresión de mediadores inflamatorios. Aunque hay poca información en las células renales, NF-κB promueve la transcripción de miR-146a, que actúa sobre TRAF6 e IRAK1, que disminuyen la activación de NF-κB dando lugar a un circuito de retroalimentación negativa<sup>210</sup>. La activación de NF-κB también tiene un papel regulación de la muerte celular<sup>207,211–213</sup>.

### 1.5.3. NF-κB en la enfermedad renal

Se ha observado activación de NF-κB en la enfermedad renal experimental y humana<sup>52</sup>. En la enfermedad renal experimental, se activa en los podocitos y en las células mesangiales durante la lesión glomerular, así como en las células tubulares durante nefropatías proteinúricas o tubulointersticiales primarias, incluida la isquemia-reperfusión, la obstrucción y el FRA séptico o tóxico<sup>57,182,209,214–216</sup>. El papel de la vía no-canónica de NF-κB durante la enfermedad renal ha sido menos estudiado, pero también se ha descrito un aumento de los componentes de la vía no-canónica durante la isquemia-reperfusión en podocitos y células tubulares<sup>217</sup>, durante la nefropatía diabética<sup>218</sup> y durante el FRA nefrotóxico<sup>209</sup>. En la enfermedad renal humana, también

existen evidencias histológicas de la activación de NF- $\kappa$ B durante la nefropatía diabética, la enfermedad glomerular y en el FRA. En general, NF- $\kappa$ B se activa en macrófagos y en células glomerulares y en las células tubulares y se correlaciona con los parámetros de gravedad de la enfermedad, como la proteinuria o la inflamación<sup>217,219–223</sup>. NF- $\kappa$ B está involucrado tanto en el inicio como en la resolución de la inflamación aguda<sup>224,225</sup>. Durante la resolución, NF- $\kappa$ B disminuye la expresión de genes inflamatorios, aumenta la expresión de genes antiinflamatorios e induce la apoptosis de los leucocitos<sup>52</sup>.

Se han descrito efectos beneficiosos de inhibidores o antagonistas de los estímulos activadores de NF- $\kappa$ B como AgII o TNF $\alpha$  en la lesión renal experimental<sup>52</sup>. Además, el parthenolide que inhibe la actividad de IKK, mejora la estabilidad de la I $\kappa$ B $\alpha$  y/o bloquea la unión al ADN de RelA<sup>226,227</sup>, mejoró la inflamación renal en modelos de glomerulonefritis inmune y en el UUO<sup>208,216</sup> y también disminuyó la inflamación intersticial en el daño renal mediado por AgII y en FRA inducido por cisplatino<sup>228</sup>. Sin embargo, la experiencia de la inhibición específica de NF- $\kappa$ B en humanos todavía es escasa y no hay ensayos clínicos en la enfermedad renal.



# Hipótesis y Objetivos



*"Ever tried. Ever failed. No matter. Try  
again. Fail again. Fail better"*

*SAMUEL BECKETT*

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Las proteínas de la familia de los NLR, más allá de NLRP3, que ha sido la más estudiada, pueden jugar un papel en la enfermedad renal.

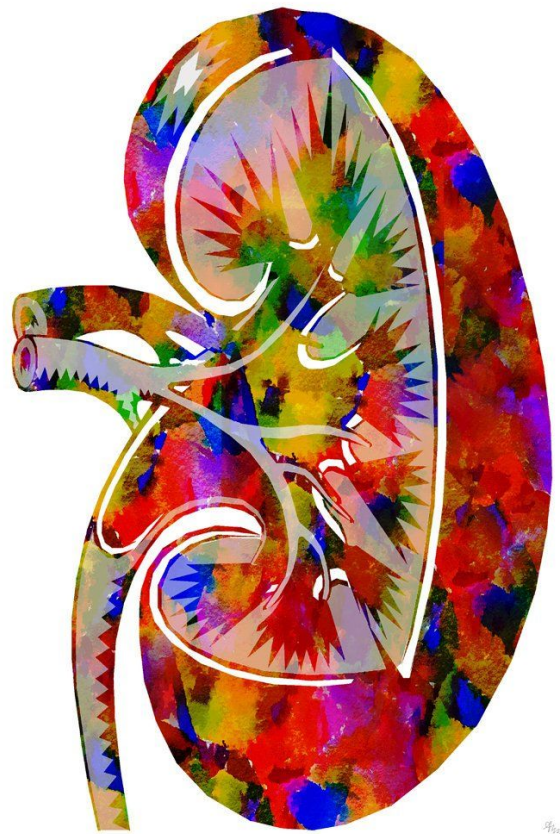
### Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido identificar, mediante transcriptómica, nuevos miembros de la familia de los NLR de potencial relevancia para el daño renal y caracterizar su contribución a nefropatías agudas y crónicas, con el fin último de diseñar nuevas estrategias terapéuticas en la enfermedad renal.

Los objetivos concretos han sido:

1. Estudiar la expresión de la familia NLR en el fracaso renal agudo y priorizar un gen miembro de esta familia para caracterizar su función durante el daño renal.
2. Caracterizar la contribución del gen priorizado (*Nlrp6*) a la patogenia del fracaso renal agudo.
3. Explorar la contribución de NLRP6 a la patogenia de la enfermedad renal crónica.
4. Estudiar la expresión de NLRP6 en el intestino, durante el daño renal.

# Material y Métodos



*“No hay barrera, cerradura ni cerrojo que  
puedas imponer a la libertad de mi mente”*

**VIRGINIA WOLF**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Modelos Animales

Todo el trabajo con animales se ha llevado a cabo de acuerdo con las directrices nacionales e internacionales y fue aprobado por el Comité de ética de investigación animal del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz.

Los modelos animales se realizaron en ratones macho y hembra de entre 12 y 14 semanas de edad Wild Type (WT) de la cepa C57BL/6 (Charles River), así como en ratones deficientes ("Knock Out", KO) para *Nlrp6* (*Nlrp6*KO) y en sus hermanos de camada ("WT Littermates"), cedidos por el Doctor Gabriel Nuñez de la Universidad de Michigan<sup>147</sup>.

Los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura constante de 25°C y con alimento y agua suministrados *ad libitum*.

##### 3.1.1. Modelo experimental de fracaso renal agudo nefrotóxico

La nefropatía inducida por ácido fólico es un modelo clásico de FRA con daño tubulointersticial, inflamación y una progresión eventual a fibrosis leve<sup>31</sup>. Además, la nefropatía por ácido fólico también ha sido descrita en humanos<sup>229</sup>.

Ratones WT C57BL/6 hembras de 12 a 14 semanas de edad recibieron una única inyección intraperitoneal con 250 mg/kg de ácido fólico (Sigma-Aldrich) o vehículo (bicarbonato sódico 0,3 mol/l). Los animales fueron eutanasiados a las 24 y 72 horas tras la inyección de ácido fólico (n=6 por grupo). A las 72 horas se suele producir el pico máximo de creatinina y urea séricas. Las muestras de riñón a tiempo de 24 horas fueron empleadas para los estudios de transcriptómica.

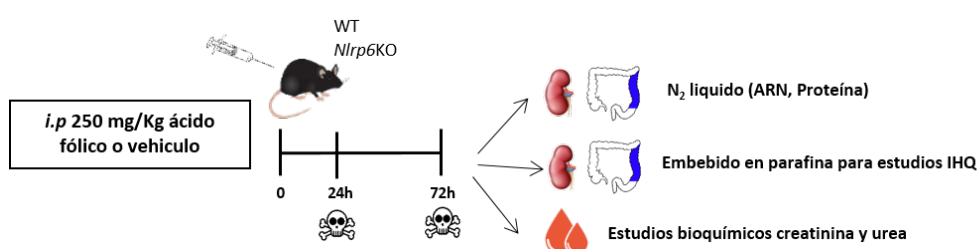
Otro modelo de FRA nefrotóxico consistió en la inyección intraperitoneal de una dosis única de 25 mg/kg de cisplatino (Sigma-Aldrich) disuelto en una solución salina al 0.9% o vehículo, en WT C57BL/6 machos de 12 a 14 semanas de edad (n=6 por grupo). La dosis de cisplatino se basó en datos previos de la literatura<sup>230</sup> y en una puesta a punto del modelo en experimentos preliminares de nuestro grupo de investigación. Los ratones fueron eutanasiados a las 72 horas, coincidiendo con el pico de gravedad del FRA (urea vehículo 37,5±2 mg/dl frente a cisplatino 115,6±12 mg/dl).



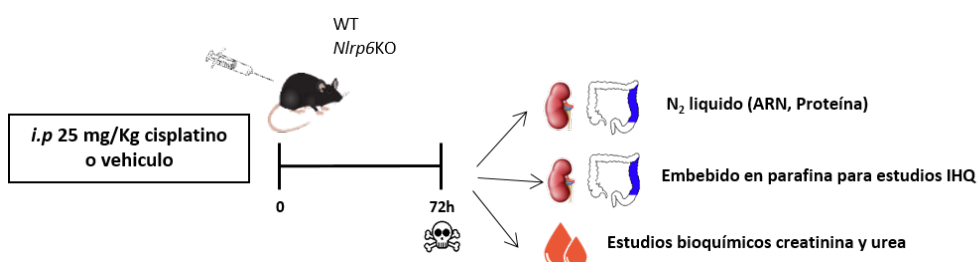
Para evaluar el papel de NLRP6 en la nefropatía por ácido fólico, hembras WT de 12 a 14 semanas de edad de ratones *Nlrp6*KO y sus “WT littermates”, recibieron una única inyección intraperitoneal de ácido fólico (Sigma-Aldrich) 250 mg/kg en 0.3 mol/L bicarbonato de sodio o vehículo y se eutanasiaron 72 horas después de la inyección (n=6 por grupo).

En ambos modelos de FRA, los ratones fueron anestesiados con la mezcla Ketamina (Ketolar®, Pfizer; 35 mg/kg) y Xilacina (Rompun®, Bayer; 5 mg/kg) por vía intraperitoneal y mediante punción cardiaca, se extrajeron muestras de plasma para los análisis bioquímicos (creatinina y urea) en el servicio de Bioquímica del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Los riñones se perfundieron *in situ* con solución salina al 0,9% (Braun) mediante la canalización del ventrículo izquierdo. A continuación, se extrajeron, se decapsularon y la mitad de un riñón se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido para los estudios de ARN y proteínas y la otra mitad se fijó en paraformaldehído y se incluyó en parafina para estudios histológicos (**Figuras 7 y 8**).

De los ratones WT, también se extrajeron fragmentos de colon, tanto en el modelo de nefropatía por ácido fólico como por cisplatino, para estudiar los niveles de expresión de NLRP6. Tras obtener una muestra de colon, se lavó su interior con solución salina varias veces, para eliminar los posibles restos que puedan interferir con el análisis. Tras esto, una muestra de colon se congeló en nitrógeno líquido para los estudios de ARN y proteínas, y la otra parte se fijó en paraformaldehído y se incluyó en parafina para estudios histológicos (**Figuras 7 y 8**).



**Figura 7: Modelo experimental de FRA por inyección de ácido fólico.** Las muestras de colon sólo se obtuvieron en ratones WT.

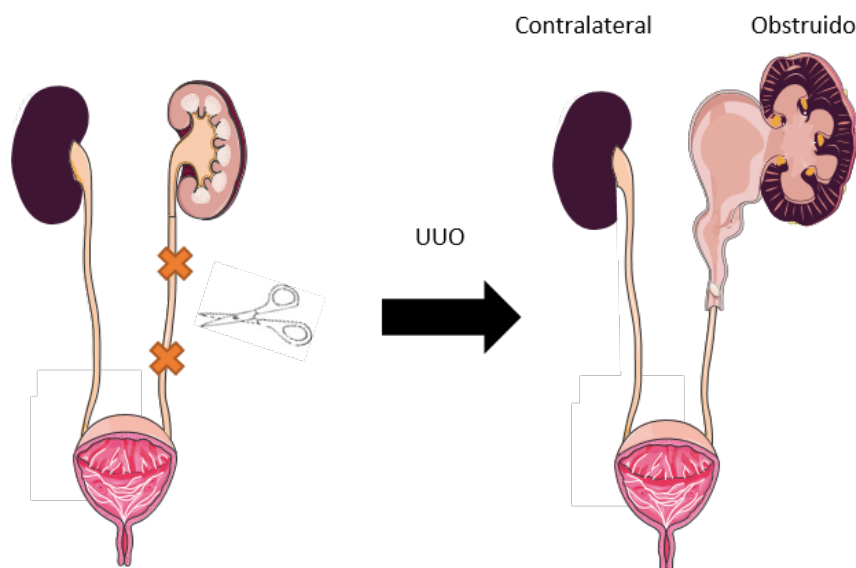


**Figura 8: Modelo experimental de FRA por inyección de cisplatino.** Las muestras de colon sólo se obtuvieron en ratones WT.

### 3.1.2. Modelo experimental de obstrucción ureteral unilateral (UUO)

El modelo de FRA no es un modelo adecuado para el estudio de la fibrosis, ya que la fibrosis resultante es suave, muy variable y puede ser más o menos grave dependiendo de la gravedad del daño inicial en respuesta a un estímulo transitorio, por lo que si mejora el FRA mediante una intervención terapéutica, la observación de una mejoría posterior de la fibrosis renal resultante podría no estar relacionada con un impacto directo de la maniobra terapéutica sobre la fibrosis, sino depender de una menor gravedad de la lesión inicial. Por ello, se estudió un modelo de fibrosis renal establecido, el modelo de UUO, caracterizado por la persistencia del estímulo lesivo durante todo el experimento. Tras la obstrucción ureteral, los riñones desarrollan las principales características de la ERC, como muerte de las células tubulares, Inflamación y una marcada fibrosis, de rápida progresión<sup>231</sup>.

La cirugía se realizó bajo anestesia inducida por isoflurano. Posteriormente, se procedió a ligar el uréter izquierdo con hilo de sutura en dos puntos suficientemente separados, para prevenir la infección del tracto urinario y por último se realizó un corte entre ambas ligaduras, dando lugar al riñón obstruido (**Figura 9**).



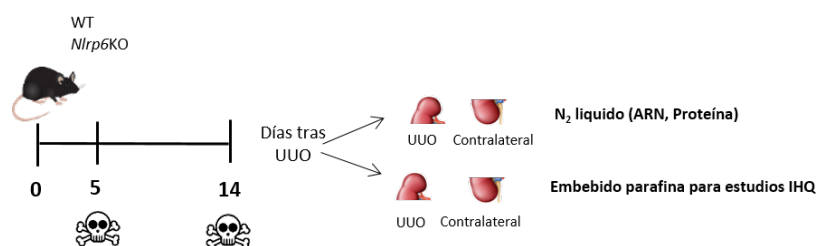
**Figura 9: Representación gráfica del UUO.**

Se emplearon ratones machos WT, *Nlrp6*KO y “WT littermates” de 12 a 14 semanas de edad (n=5 por grupo). Se estudiaron machos, ya que la ausencia de ovarios hace más fácil técnicamente el modelo. Los animales fueron eutanasiados a los 5 y 14 días después de la cirugía (ratones WT) o 14 días después de la cirugía (ratones *Nlrp6*KO y

sus “WT littermates”). Los riñones obstruidos se compararon con su respectivo riñón contralateral, no obstruido, en cada ratón.

Al igual que en el modelo del FRA, los ratones fueron anestesiados con Ketamina (Ketolar®, Pfizer; 35 mg/kg) y Xilacina (Rompun®, Bayer; 5 mg/kg) por vía intraperitoneal antes de perfundir los riñones *in situ* con solución salina al 0,9% mediante la canalización del ventrículo izquierdo del corazón. Luego se extrajeron los riñones, se decapsularon y la mitad de un riñón se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido para estudios de ARN y proteínas y la otra mitad se fijó en paraformaldehído y se incluyó en parafina para estudios histológicos (**Figura 10**).

En este modelo no se extrajeron muestras de sangre, puesto que el riñón contralateral compensa gran parte de la pérdida de la función en el riñón obstruido y por consiguiente, no se producen cambios en las concentraciones séricas de creatinina o urea o estos son leves.



**Figura 10: Modelo experimental de Obstrucción Ureteral Unilateral (UUO).**

## 3.2. Cultivos celulares

### 3.2.1. Líneas celulares

Para los experimentos *in vitro*, se empleó una línea celular de túbulo proximal renal murino (MCT). Estas células proceden originariamente de ratones SJL y fueron cedidas por el profesor Eric G Neilson de la Universidad de Pensilvania<sup>232</sup>. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal decomplementado (SBF, Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicilina (Sigma Aldrich), 100 µg/ml Estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 2 mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron a 37°C, bajo una presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5% y una humedad relativa del 95%.

### 3.2.2. Estudios de silenciamiento (siARNs)

Las células se cultivaron en placas de seis pocillos (Costar) y se transfectaron con una mezcla de 40 nmol/mL de pequeños ARNs interferentes para *Nlrp6* (siARNs) (Ambion, Applied Biosystems,), en medio de suero reducido Opti-MEM I (Termofisher Scientific) con Lipofectamina 2000 (Invitrogen)<sup>233</sup> durante dos horas en la estufa a 37°C y después se añadió medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de SBF sin glutamina ni penicilina. Como control se empleó un silenciador negativo control (Ambion, Applied Biosystems) proporcionado por el fabricante.

Al día siguiente se retiró el medio que contenía los complejos de transfección, se lavaron las células con suero salino estéril 0,9 % (Braun) y se añadió medio completo con suero, penicilina y glutamina. 24 horas antes de la recolección, las células fueron privadas de suero. El tiempo de recogida fue seleccionado en estudios previos de tiempo-respuesta en los que se evaluó la disminución de la expresión de la proteína de NLRP6 en respuesta al silenciamiento. El silenciador negativo control no redujo los niveles de proteína de NLRP6. En los experimentos en los que se emplearon los inhibidores de las MAPK ERK1/2 y p38, el inhibidor se añadió 24 horas después del silenciamiento y las muestras se recogieron 24 horas más tarde (48 horas después del silenciamiento).



### 3.2.3. Inhibidores

Se emplearon los inhibidores de las MAPK ERK1/2, **PD98059** (20μM) y el de P38, **SB203580** (5 μM) (Stressgen Bioreagent). Ambos fueron disueltos en DMSO para su uso. Las concentraciones fueron elegidas en base a la literatura y a experiencia previa en el laboratorio.

### 3.2.4. Agentes profibróticos

Para inducir la fibrosis *in vitro* se han tratado las MCT con el Factor de crecimiento transformante Beta (TGF-β1) (Prepotech) a 1 ng/ml y las células fueron recogidas a las 3 y 6 horas para su análisis de ARNm.

### 3.3. Análisis de proteínas

#### 3.3.1. Extracción y cuantificación

Para extraer proteínas, los tejidos congelados (riñón y colon) se pulverizaron en un troquel y el pulverizado obtenido se recogió en un tampón de lisis (TrisHCL 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 25 mM, Tritón X-100 0,2%, NP-40 0,3%, PMSF 0,1%) suplementado con el inhibidor comercial de proteasas C0mplete™, (Roche Diagnostics) y con el inhibidor comercial de fosfatasas PhosSTOP™ (Roche Diagnostics). Las células cultivadas se levantaron con ayuda de un raspador y recogieron en el propio medio de cultivo, se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos y el pellet se resuspendió en suero salino para eliminar los restos de medio. Se repitió el proceso y el pellet se resuspendió en el mismo tampón de lisis que los tejidos.

Las muestras fueron resuspendidas varias veces en el tampón de lisis, incubadas en hielo durante 15 minutos en reposo y centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue transferido a un tubo limpio para su criopreservación. La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método del Ácido Bicinconínico, BCA (Pierce).

Las muestras de tejido renal humano sano se obtuvieron del Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, que forma parte de la Plataforma Española de Biobancos (PT17/0015/0006).

#### 3.3.2. Western Blot

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (Fisher) al 10-12 % en condiciones reductoras y a continuación se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBST (1 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl y 0,1% Tween-20) con 5% de leche desnatada para evitar uniones inespecíficas y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en la solución de bloqueo y en agitación constante durante toda la noche a 4°C (**Tabla 4**).

Al día siguiente, las membranas se lavaron en TBS/Tween 0,5% un mínimo de 4 veces durante al menos 10 minutos por lavado, para eliminar el exceso de anticuerpo primario y posibles uniones inespecíficas. Tras esto, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 5**), conjugado con peroxidasa de

rábano durante 1 hora en agitación, a temperatura ambiente. Tras lavarlas de nuevo con la solución de lavado un mínimo de 4 veces, para eliminar los restos de anticuerpo secundario, se revelaron mediante quimioluminiscencia usando el reactivo ECL (millipore, EMD) en el sistema Amersham imager 600 (GE Healthcare)<sup>31</sup>.

Las bandas fueron cuantificadas con el programa informático Quantity One (BioRad). Los resultados de los análisis de niveles de proteína, se expresaron como porcentaje del incremento respecto al control de carga correspondiente (anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina, ERK1/2 y p38) (**Tabla 4**).

**Tabla 4: Anticuerpos primarios usados en el Western Blot.**

Anticuerpo primario	Casa comercial	Referencia	Dilución	Anticuerpo secundario
Anti-NLRP6 (murino)	Santa Cruz	sc-50635	1/500	Anti-IgG cabra HRP
Anti-NLRP6 (humano)	Santa Cruz	sc-50636	1/500	Anti-IgG cabra HRP
Anti-ERK1/2 fosforilado	Santa Cruz	sc-7383	1/500	Anti-IgG ratón HRP
Anti-p38 fosforilado	Santa Cruz	sc-7973	1/500	Anti-IgG ratón HRP
Anti-ERK1/2 total	Santa Cruz	sc-514302	1/2000	Anti-IgG conejo HRP
Anti-p38 total	Santa Cruz	sc-728	1/2000	Anti-IgG cabra HRP
Anti- $\alpha$ Tubulina	Sigma-Aldrich	T5168	1/10000	Anti-IgG ratón HRP

**Tabla 5: Anticuerpos secundarios usados en el Western Blot.**

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti-IgG cabra HRP	Santa Cruz	sc-2020	1/2000
Anti-IgG ratón HRP	GE healthcare	NA931	1/2000
Anti-IgG conejo HRP	GE healthcare	NA931	1/2000

### 3.4. Transcriptómica

En esta tesis doctoral se llevaron a cabo dos estudios de transcriptómica:

#### 3.4.1. RNA-seQ

En riñones de 3 ratones hembra WT C57BL/6 adultos controles, se realizó un estudio transcriptómico RNA-SeQ, en el que se analizó la expresión en riñón sano de los genes de la familia de los NLR, incluidas las subfamilias NLRP y NLRC. A partir de 1  $\mu$ g total de ARN del riñón, se purificó la fracción PolyA<sup>+</sup>, se fragmentó aleatoriamente y se convirtió en ADN bicatenario Complementario (ADNc). El ADNc se procesó mediante tratamientos enzimáticos posteriores de reparación de los extremos, de adición de colas de adenina y de ligación a adaptadores con el kit “TruSeq Stranded mRNA Sample

Preparation Part # 15031047 Rev. D" de Illumina realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

La biblioteca ligada al adaptador se completó mediante PCR con los primers "Paired-ends" (PE) de Illumina (8 ciclos). La biblioteca de ADNc purificado resultante se aplicó a una superficie sólida de Illumina para la generación de clusters y se secuenció para 50 bases en un formato de lectura única (Illumina HiSeq 2000). El análisis de los datos de la secuenciación se realizó con el pipeline Nextpresso<sup>234</sup>, siendo la calidad de la secuenciación previamente verificada con FastQC<sup>235</sup>. Las lecturas obtenidas fueron alineadas frente al genoma de ratón (GRCm38/mm10) con TopHat-2.0.1050, utilizando Bowtie 1.0.051 y Samtools 0.1.1952, permitiendo dos apareamientos incorrectos y cinco multi hits. El ensamblaje de las transcripciones, la estimación de su abundancia y la expresión diferencial se calcularon con Cufflinks 2.2.150, usando los datos del genoma de ratón (GRCm38/mm10). Las transcripciones con valores de expresión de FPKM inferiores a 0,05 se consideraron no expresadas y se excluyeron de los análisis.

### 3.4.2. Arrays Transcriptómicos

Para evaluar los cambios en la expresión génica durante el FRA, se emplearon Arrays de transcriptómica de Affymetrix en la Unidad Genómica Moncloa, (Fundación Parque Científico, Madrid, España) en muestras de ratones hembra WT C57BL/6, 3 inyectados con vehículo y 3 con ácido fólico, a las 24 horas de la inyección. Los archivos de imagen se obtuvieron inicialmente a través del programa informático Affymetrix GeneChip Command Console. Posteriormente, se realizó un análisis multichip más robusto, utilizando el programa informático Affymetrix Expression Console. El análisis del grado de significancia del análisis multichip se realizó utilizando el paquete lima (Babelomics, <http://www.babelomics.org>) y una tasa de descubrimientos falsos (FDR) del 5% para identificar, entre los grupos analizados, genes regulados diferencialmente de forma significativa<sup>26</sup>. Los resultados completos de estos arrays se han publicado anteriormente<sup>236</sup>.

## 3.5. Minería de datos

Para identificar los genes de la familia de los NOD-Like Receptors (NLR) de potencial interés para la ERC humana, se utilizó la base de datos Nephroseq versión 5.0 (<http://v5.nephroseq.org/>), para buscar genes que codifican para los NLR y su relación con la TFG estimada (TFGe). El p valor se ajustó a <0.05. Nos centramos en los cambios en la expresión génica observados en condiciones de enfermedad renal humana que usaran muestras de riñón completo, corteza renal o tubulointersticio.



### 3.6. ELISA

La concentración plasmática de la citocina proinflamatoria murina IL-18 se determinó mediante enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) según el protocolo específico de la casa comercial (R&D Systems) empleando una curva estándar de IL-18 recombinante y el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para la detección colorimétrica. La absorbancia se midió por espectrofotometría a 450 nm. Los valores se han expresado en pg/ml.

### 3.7. Análisis de ARN

#### 3.7.1. Extracción de ARN

El ARN total procedente de muestras de tejido congelado (riñón y colon) se extrajo pulverizando el órgano en un troquel y se lisó posteriormente siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante para el reactivo TriPure (Roche Diagnostics). En las muestras procedentes de cultivos celulares, se retiró el medio de cultivo y con la ayuda de un raspador, se recogieron las células para su posterior lisis en el reactivo TriPure, también siguiendo el protocolo del fabricante. Se cuantificó el ARN total en un espectrofotómetro tipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) por medida de absorbancia a 260 nm. La pureza de la muestra se comprobó mediante los cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230 nm, cuyos valores mayores de 1,8 indicaron ausencia de contaminación proteica y fenólica respectivamente.



#### 3.7.2. Transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real

La transcripción reversa (RT) se realizó con 1 o 4 µg de ARN total utilizando el High Capacity ADNc Archive Kit (Applied Biosystems, Life Technologies), en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) con las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

Los niveles de ADNc de los genes a estudio se determinaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (QPCR) mediante el sistema de detección de secuencias Real-Time FAST PCR 7500 (Life Technologies) con el software Prism 7000 System SDS (Applied Biosystems). Para ello, se empleó el preparado comercial Master Mix (Roche Diagnostics) conteniendo la TaqDNA polimerasa activada por calor, así como nucleótidos y tampón necesarios para la reacción, junto con la muestra de ADNc y el cebador específico comercial de cada gen diana. En la misma reacción (multiplex) o

como reacción independiente (singleplex), según el gen a estudiar, se añadieron cebadores para amplificar también el ARN del gen que codifica la Gliceraldehído-Fosfato-DesHidrogenasa (*Gapdh*) como control interno de la reacción. La secuencia del programa de PCR a tiempo real fue: un paso inicial de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, recogiendo las medidas en esta última etapa de cada ciclo. Todas las sondas prediseñadas fueron de Applied Biosystems (**Tabla 6**) y todas las medidas se hicieron por duplicado. Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de *Gapdh*. El número de copias de ARNm se calculó a partir del valor Ct (ciclo umbral) mediante el método de cuantificación  $2^{-\Delta CT}$ .

Los resultados de los análisis de niveles de ARNm se expresaron como porcentaje del incremento respecto al control correspondiente.

**Tabla 6: Sondas empleadas en la PCR cuantitativa a tiempo real.**

Gen	Fluoróforo/Especie	Referencia
<i>Ccl2 (Mcp-1)</i>	FAM/Ratón	Mm00441242_m1
<i>Ccl5 (Rantes)</i>	FAM/Ratón	Mm01302428_m1
<i>Klotho</i>	FAM/Ratón	Mm00502002_m1
<i>Nlrp6</i>	FAM/Ratón	Mm01279026_m1
Colágeno I	FAM/Ratón	Mm00483888_m1
Fibronectina I	FAM/Ratón	Mm01256744_m1
<i>Gapdh</i>	FAM/Ratón	Mm99999915_g1
<i>Gapdh</i>	VIC/Ratón	Mm99999915_g1

### 3.8. Inmunohistoquímica

Las tinciones inmunohistoquímicas se emplearon para localizar proteínas en los tejidos.

Con el microtomo, se realizaron cortes de 3µM en parafina que fueron montados en portas de carga positiva (DAKO)<sup>233</sup>. Las muestras fueron desparafinadas a aproximadamente 60°C como mínimos dos horas, hidratadas con concentraciones de alcoholes decrecientes y posteriormente se hizo la recuperación antigénica en una solución de citrato utilizando el sistema PT-link de Dako (pH 6, a 95°C durante 20 minutos).

A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las muestras durante 30 minutos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando la solución PBS/BSA 4%/suero 10% (de la misma especie en que se produjo el anticuerpo secundario). Posteriormente, los tejidos se

incubaron con el anticuerpo específico toda la noche (diluido en la misma solución de bloqueo de PBS/BSA 4%/suero 10%) a 4°C y en condiciones de humedad (**Tabla 7**). Tras lavar el tejido con la solución de lavado PBST (Tween 0,1%), se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (**Tabla 8**) 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario biotinilado, se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC HRP system; Vector laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este complejo se había preparado 30 minutos antes en condiciones de oscuridad y humedad. Como controles negativos, las muestras se incubaron con una inmunoglobulina no específica del mismo isotipo que el anticuerpo primario. A continuación, las muestras se revelaron utilizando la 3,3'-diaminobencidina (Dako) como sustrato que reacciona con la HRP, dando lugar a un precipitado de color marrón. Finalmente, los cortes se contrastaron con hematoxilina (Fisher), se deshidrataron, se fijaron en xilol y se montaron utilizando DPX (Merck). Las preparaciones fueron analizadas mediante microscopía óptica.

**Tabla 7: Anticuerpos primarios usados en la inmunohistoquímica.**

Anticuerpo primario	Casa comercial	Referencia	Dilución	Anticuerpo secundario
Anti-NLRP6 (murino)	Santa Cruz, CA, USA	sc-50635	ene-75	IgG conejo anti-cabra biotina
Anti-NLRP6 (humano)	Santa Cruz, CA, USA	sc-50636	ene-75	IgG conejo anti-cabra biotina
Anti-ERK1/2 fosforilado	Cell signalling, Ne	4370	1/100	IgG cabra anti-ratón biotina
Anti-p38 fosforilado	Cell signalling, Ne	4511	1/100	IgG cabra anti-ratón biotina
Anti-f480	Biorad, CA	MCA497	ene-50	IgG conejo anti-rata biotina
Anti-Ly6G	Biolegend, CA	127607	1/100	IgG conejo anti-rata biotina
Anti-Colágeno I	Merck,GE	AB765P	1/250	IgG conejo anti-conejo biotina
Anti-αsma	Abcam	Ab5694	1/100	IgG conejo anti-conejo biotina

**Tabla 8: Anticuerpos secundarios biotinilados usados en la inmunohistoquímica.**

Anticuerpo primario	Casa comercial	Referencia	Dilución
IgG conejo anti-cabra biotina	Invitrogen, USA	11859200	1/200
IgG cabra anti-ratón biotina	Merck,GE	AP124B	1/200
IgG conejo anti-rata biotina	Invitrogen, USA	31834	1/200
IgG burro anti-conejo biotina	Merck,GE	AP132B	1/200

Para el estudio de muerte celular se utilizó la técnica de TUNEL (del inglés “deoxynucleotidyl-Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling”) utilizando el “In Situ Cell Death Detection Kit” (Roche) siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante<sup>31</sup>. Durante la apoptosis las endonucleasas digieren el ADN genómico en fragmentos oligonucleosomales de 180-200 pares de bases, aunque posteriormente se observó que TUNEL también tiñe otras formas de muerte celular. Los fragmentos de ADN se marcan mediante la incorporación catalítica de 16-UTP (marcada con fluoresceína) en los extremos libres mediante la adición de la enzima transferasa TdT (deoxinucleotidil terminal)<sup>237,238</sup>. Los núcleos se contrastaron con DAPI (Sigma-Aldrich)

y finalmente los cortes se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich) y la fluorescencia se detectó mediante microscopía confocal (Confocal System TCS SP5, Leica). Se fotografiaron al menos 10 campos por sección.

Para cuantificar la fibrosis se usó la tinción histoquímica con rojo sirio. Los cortes de tejido se desparafinaron con xilol y se pasaron por concentraciones gradualmente decrecientes de etanol hasta etanol 70%, donde los cortes mantuvieron durante 5 días a 4 °C. El colorante Red 80 (Sigma) se disolvió en ácido pícrico (al 1%) dos días antes de su utilización y los cortes se incubaron con esta mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron con un lavado de etanol 96%, 100% y xilol y posteriormente los cortes se montaron en medio DPX (Merck).

Las imágenes se cuantificaron utilizando el software Image-Pro Plus (Cybernetics, Bethesda, MD) a partir de imágenes tomadas a ciegas de al menos 10 campos por sección de los cortes del colon o de la corteza renal a un aumento de 20x de magnificación. Los resultados se expresaron como porcentaje de área teñida versus área total cuantificada.

El infiltrado renal por macrófagos y neutrófilos se estudió usando los anticuerpos anti-F4/80 y anti-Ly6G, respectivamente. Para leucocitos y TUNEL, las células positivas se cuantificaron a mano, a ciegas del tipo de muestra estudiada, en al menos 10 campos por sección de la corteza renal y se expresaron como número de células positivas o núcleos positivos por campo.

Las inmunohistoquímicas en tejido humano se realizaron en muestras de nefrectomías con tejido renal conservado o enfermo procedentes del Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz: un varón de 76 años con creatinina sérica 0.9 mg/dl, proteinuria negativa con tira reactiva y estructura renal preservada en microscopía óptica y varón de 72 años con creatinina sérica 1,6 mg/dl, 50 mg/dl de proteinuria y signos de lesión tubular y fibrosis intersticial). También se han empleado muestras de colon humano de pacientes con daño renal (**Tabla 9**).

**Tabla 9: Datos clínicos de muestras de colon humano.**

Paciente	EDAD	Filtrado glomerular (ml/mil/1,73m2)	Sexo
Control	69	92	mujer
Control	64	78	mujer
Control	66	93	varón
<b>ERC avanzada</b>	<b>64</b>	<b>10</b>	<b>mujer</b>
<b>ERC avanzada</b>	<b>79</b>	<b>11</b>	<b>mujer</b>

### 3.9. Estudios de muerte celular en células cultivadas

Las células se cultivaron en placas de seis pocillos y se transfectaron con los siARNs de *Nlrp6* y con el negativo tal y como se indicó en el apartado de estudios de silenciamiento.

La muerte celular se estudió por citometría de flujo con un Kit comercial que tiñe las células con anexina V-PE y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences). Para ello, las células se levantaron con tripsina y se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet de células se lavó con PBS. Se centrifugó de nuevo 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 60 µl de tampón de unión contenido en el kit y se tiñeron con 2,5 µl de ficoeritrina-anexina V y 2,5 µl de 7-AAD durante 15 minutos a 37°C en la oscuridad. Posteriormente se añadieron 240 µl de tampón de unión, justo antes de la citometría de flujo. Las células se analizaron utilizando el citómetro FACS Canto y el programa informático FACS Diva (BD Biosciences). La tinción con anexina V es un proceso previo a la pérdida de integridad de la membrana que ocurre en las últimas etapas de la muerte celular como resultado de procesos apoptóticos o necróticos. Por lo tanto, la tinción con anexina V se usa típicamente junto con un colorante vital como el 7-AAD. Por lo tanto, las células teñidas sólo con anexina V se evaluaron como si se encontrasen en una fase temprana de muerte celular apoptótica, mientras que las células teñidas con anexina V y 7AAD fueron evaluadas como si se encontrasen en un estadio de muerte celular por apoptosis tardía o por necrosis.



### 3.10. Estadística

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa estadístico SPSS 11.0. Los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Los ensayos *in vitro* fueron replicados un mínimo de 3 veces y en los modelos *in vivo* se emplearon un mínimo de 3 ratones por cada situación experimental. Para dos grupos se empleó el test de t de student y para tres o más el de ANOVA para datos con distribución normal y Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, respectivamente, para distribución no normal. Para la considerar las diferencias estadísticamente significativas se estableció una  $p < 0,05$ .

### 3.11. Esquema resumen del abordaje experimental

**La Figura 11** resume la estrategia investigadora desarrollada en esta tesis doctoral. Mediante un abordaje no sesgado de biología de sistemas (transcriptómica renal) se

caracterizaron los genes expresados en el riñón sano murino y sus niveles de expresión, así como los genes diferencialmente expresados en el FRA murino. A continuación, se utilizó una aproximación basada en hipótesis para caracterizar la expresión de genes NLR, dada la evidencia de participación del inflammasoma en el daño renal. Estos abordajes identificaron a *Nlrp6* como un gen de interés para el daño renal. Su potencial relevancia clínica se confirmó mediante minería de datos con la base de datos Nephroseq, antes de pasar a confirmar la expresión diferencial en el FRA mediante RT-QPCR y Western Blot. Mediante inmunohistoquímica se localizó qué células producían su expresión tanto en muestras de riñones murinos, como en biopsias humanas. Una vez localizada su expresión se llevaron a cabo estudios funcionales *in vivo* en ratones WT y *Nlrp6*KO en dos modelos experimentales de FRA (por sobredosis de ácido fólico y por cisplatino) y en un modelo de ERC (UUO), así como *in vitro* (MCT) mediante el uso de siARNs específicos. Tanto *in vivo* como *in vitro* se estudió el papel de NLRP6 en la inflamación, muerte celular y en la fibrosis. Posteriormente se evaluó la expresión de NLRP6 en el colon, tras el FRA experimental inducido tanto por fólico como por cisplatino, así como en biopsias de colon de pacientes con ERC.

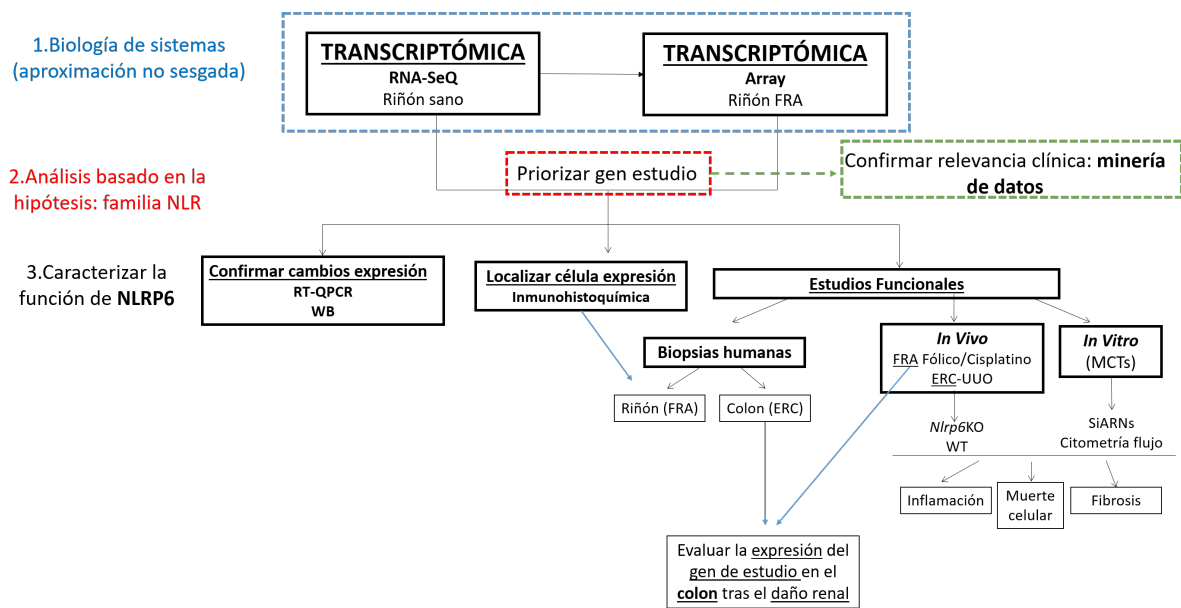


Figura 11: Esquema del abordaje experimental.

# Resultados



*“Trabaja duro, en silencio, deja que tu éxito haga todo el ruido”*

*ANÓNIMO*

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación de *Nlrp6* como gen de interés en la patogenia del daño renal

El primer paso del abordaje experimental fue identificar genes NLR relacionados con el inflammasoma, de potencial interés en la patogenia y tratamiento de la enfermedad renal.

#### 4.1.1. La expresión génica de *Nlrp6* está disminuida durante el FRA murino

El FRA nefrotóxico se caracteriza por un aumento de los niveles de creatinina sérica, muerte de células tubulares, inflamación intersticial y recuperación posterior de la función renal, aunque también puede evolucionar a fibrosis leve<sup>4,31</sup>. Previamente, nuestro grupo había utilizado el análisis transcriptómico de un modelo de FRA nefrotóxico para identificar genes de potencial interés patogénico para el daño renal. En esta ocasión, nos hemos centrado en los miembros de la familia de los NLR que están implicados en el daño renal mediante su participación en el inflammasoma y la modulación de la muerte celular y de la inflamación<sup>137,140,146,239–243</sup>. En concreto, un aumento de la actividad de NLRP3 promueve la lesión renal<sup>137,140,239–243</sup>. Mediante un array transcriptómico de un modelo experimental murino de FRA inducido por una sobredosis de ácido fólico, confirmamos que los niveles de ARNm de *Nlrp3* estaban aumentados en los ratones con FRA, en comparación con los ratones a los que se les inyectó el vehículo (**Tabla 10**). Sin embargo, sorprendentemente, la expresión de ARNm de otros dos miembros de la familia de los NLR murinos, *Nlrp6* y *Naip3*, estaba disminuida (**Tabla 10**).



**Tabla 10: Array transcriptómico de tejido renal a las 24 horas tras la inducción de FRA nefrotóxico por inyección de ácido fólico o tras la inyección del vehículo, en ratones WT.** Se muestran los miembros de la familia de los NLR, incluidas las familias NLRP y NLRC. Los niveles de expresión se indican como el cociente entre los niveles de expresión de los ratones inyectados con ácido fólico y los controles inyectados con el vehículo. Se muestran en negrita los genes expresados diferencialmente con valores de FDR <0.1

Símbolo gen	Cociente FRA vs vehículo	p-valor	Adj. p-valor (FDR)
<b><i>Nlrp6</i></b>	<b>0.55</b>	<b>0.008</b>	<b>0.06</b>
<b><i>Naip3</i></b>	<b>0.80</b>	<b>0.004</b>	<b>0.038</b>
<i>Nod1 (Nlrc1)</i>	0.91	0.23	0.50
<i>Naip1</i>	0.92	0.33	0.62
<i>Nlrc4</i>	0.94	0.63	0.84
<i>Nlrp10</i>	0.95	0.43	0.71
<i>Nlrp4f</i>	0.98	0.72	0.89
<i>Nlrp4a</i>	0.99	0.80	0.92
<i>Nlrc3</i>	1.00	0.93	0.98
<i>Nlrp4b</i>	1.00	0.98	0.99
<i>Nlrp4d</i>	1.01	0.84	0.94
<i>Nlrp9b</i>	1.01	0.83	0.94
<i>Nlrx1</i>	1.01	0.84	0.94
<i>Nod2 (Nlrc2)</i>	1.02	0.71	0.88
<i>Nlrp4e</i>	1.02	0.75	0.90
<i>Nlrp5</i>	1.02	0.80	0.93
<i>Nlrp9c</i>	1.04	0.56	0.80
<i>Nlrp1a</i>	1.06	0.47	0.74
<i>Nlrp9a</i>	1.06	0.34	0.63
<i>Nlrp14</i>	1.06	0.51	0.76
<i>Naip5</i>	1.06	0.41	0.69
<i>Nlrp4c</i>	1.08	0.27	0.55
<i>Naip2</i>	1.08	0.26	0.55
<i>Nlrp2</i>	1.09	0.21	0.48
<i>Naip6</i>	1.11	0.15	0.39
<i>Nlrp1b</i>	1.12	0.097	0.30
<i>Nlrp1c</i>	1.24	0.024	0.12
<b><i>Nlrp3</i></b>	<b>1.35</b>	<b>0.004</b>	<b>0.038</b>
<b><i>Nlrc5</i></b>	<b>1.52</b>	<b>0.002</b>	<b>0.027</b>
<b><i>Ciita</i></b>	<b>1.54</b>	<b>0.000</b>	<b>0.007</b>

#### 4.1.2. *Nlrp6* es el gen NLR con mayor expresión constitutiva en el riñón adulto murino sano

A continuación, estudiamos la expresión constitutiva de los miembros de familia NLR en el riñón adulto sano en ratones mediante transcriptómica por RNA-seq, que permite una evolución cuantitativa absoluta más precisa que los arrays transcriptómicos. *Nlrp6* fue el miembro de la familia NLR con mayor expresión génica

constitutiva en el riñón de los ratones adultos, sugiriendo una función del mismo en el riñón sano (**Tabla 11**).

**Tabla 11: Análisis transcriptómico mediante RNA-seq de tejido renal de ratones WT adultos sanos.** Se muestran los miembros de la familia de los NLR, incluidas las familias NLRP y NLRC y los niveles de expresión se indican como la media  $\pm$  EEM de FKPM de 3 ratones.

Símbolo gen	Media FPKM	EEM
<i>Nlrp6</i>	1188.20	118.31
<i>Nod1</i>	249.41	8.77
<i>Nlrp1</i>	194.65	9.61
<i>Nlrp5</i>	80.27	8.50
<i>Nlrp1a</i>	63.02	7.65
<i>Ciita</i>	53.62	1.70
<i>Naip2</i>	37.05	4.07
<i>Nod2</i>	31.91	4.28
<i>Nlrp4</i>	26.62	9.36
<i>Naip5</i>	20.72	1.17
<i>Nlrp3</i>	18.51	2.23
<i>Naip6</i>	7.19	0.24
<i>Nlrp1b</i>	6.90	0.93
<i>Nlrp3</i>	6.87	1.15
<i>Naip1</i>	4.89	1.40
<i>Nlrp1c-ps</i>	4.47	0.28
<i>Nlrp10</i>	1.71	0.66
<i>Nlrp4f</i>	1.39	0.70
<i>Naip7</i>	1.39	0.85
<i>Nlrp9b</i>	0.36	0.36
<i>Nlrp2</i>	0.34	0.34
<i>Nlrp12</i>	0	0
<i>Nlrp14</i>	0	0
<i>Nlrp4a</i>	0	0
<i>Nlrp4b</i>	0	0
<i>Nlrp4c</i>	0	0
<i>Nlrp4e</i>	0	0
<i>Nlrp4g</i>	0	0
<i>Nlrp5</i>	0	0
<i>Nlrp9a</i>	0	0
<i>Nlrp9c</i>	0	0

RE

#### 4.1.3. Los niveles de expresión de ARNm de *NLRP6* se correlaciona inversamente con la TFGe en biopsias humanas

Los datos preclínicos sugerían que, entre los genes de la familia de NLR, *NLRP6* podría jugar un papel en la patogenia del daño renal. Sin embargo, resulta necesario que los estudios en animales de experimentación sean clínicamente relevantes. Para abordar la potencial relevancia clínica de la expresión diferencial de genes NLR en modelos preclínicos, recurrimos a la minería de datos en la base de datos transcriptómica

Nephroseq. En concreto, evaluamos la correlación entre los niveles de expresión renal de los genes NLR y la función renal, evaluada como la TFGe o los niveles de creatinina sérica, utilizando Nephroseq 5.0. De los 22 genes de la familia de los NLR estudiados, la expresión génica renal de *NOD1*, *NOD2*, *NLRC4*, *NLRP3*, *NLRP3* y *NLRX1* se correlacionó negativamente con la TFGe o los niveles creatinina sérica (**Tabla 12**).

**Tabla 12: Correlación entre la expresión de los genes NLR y la TFGe o los niveles de creatinina sérica en biopsias de riñón humano.** Datos obtenidos de Nephroseq 5.0 (<http://v5.nephroseq.org/>); consultada el 11 de enero de 2018). Para los datos en los que tanto la creatinina sérica como la TFGe estaban disponibles y se correlacionaron significativamente con la expresión del ARNm, sólo se muestran los datos de la TFGe. MDRD y CKD-EPI son las diferentes ecuaciones empleadas para el cálculo de la TFGe. Se consideró la correlación significativa para aquellos en los que el valor de p para la correlación fue  $p < 0.05$ . Sólo se estudiaron los genes con expresión renal basal (**Tabla 11**).

Familia NLR	Gen	Parámetro	p-valor	r-valor	Muestra	Referencia
NLRA	CIITA	TFGe (MDRD)	6.08 e-6	-0.597	Síndrome nefrótico tubulointersticial	Sampson MG et al (2016)
		TFGe (MDRD)	0.005	0.574	Diabetes tubulointersticial	Woronicieka KI et al (2011)
		TFGe (MDRD)	0.007	0.198	Enfermedad renal crónica tubulointersticial	Ju W et al (2015)
		TFGe (MDRD)	0.007	-0.646	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
NLRC	NOD1	TFGe (MDRD)	0.003	-0.692	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
		TFGe (MDRD)	0.031	-0.678	Diabetes tubulointersticial	Woronicieka KI et al (2011)
		TFGe (MDRD)	0.032	-0.750	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
		TFGe (MDRD)	0.044	-0.767	Lupus tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
	NOD2	TFGe (MDRD)	0.001	-0.647	Diabetes tubulointersticial	Woronicieka KI et al (2011)
		TFGe (MDRD)	0.007	-0.643	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
	NLRC4	TFGe (MDRD)	0.034	-0.532	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
		TFGe (MDRD)	0.034	-0.532	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
NLRP	NLRP2	TFGe (MDRD)	0.002	-0.627	Diabetes tubulointersticial	Woronicieka KI et al (2011)
	NLRP3	TFGe (MDRD)	0.002	<b>-0.614</b>	Diabetes tubulointersticial	Woronicieka KI et al (2011)
		TFGe (MDRD)	0.005	<b>-0.394</b>	Síndrome nefrótico tubulointersticial	Sampson MG et al (2016)
		TFGe (MDRD)	0.043	<b>-0.512</b>	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
	NLRP6	TFGe (MDRD)	3.30e-5	<b>0.556</b>	Síndrome nefrótico tubulointersticial	Sampson MG et al (2016)
		TFGe (MDRD)	0.020	<b>0.832</b>	Lupus tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
NLRX	NLRX1	TFGe (CKD-EPI)	0.007	-0.933	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
		Creatinina sérica	0.033	0.967	Diabetes tubulointersticial	Schmid H et al (2006)
		TFGe (MDRD)	0.040	-0.517	Síndrome nefrótico tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013
		TFGe (MDRD)	0.043	-0.769	Lupus tubulointersticial	European Renal cDNA Bank project (ERCB) 2013

La observación de la correlación negativa entre los niveles de ARNm de *NLRP3* renal y la TFG (Tabla 12) apoya la validez y fiabilidad del análisis, ya que ha sido el gen más ampliamente estudiado y la activación de *NLRP3* se ha relacionado de forma consistente con un papel patogénico en el daño renal: cuanto más altos son los niveles de *NLRP3* renal, más grave fue la disfunción renal, lo que concuerda con los datos de la literatura que indican que el NLRP3 es un impulsor de la fibrosis renal y la progresión de la ERC<sup>129,242,244–246</sup>. Por el contrario, *NLRP6* fue el único gen con una correlación positiva entre los niveles de ARNm en el riñón y la TFG (Tabla 12). Es decir, cuanto más bajos sean los niveles de ARNm de *NLRP6*, más grave sería el daño renal. Esto concuerda con la observación preclínica de expresión constitutiva de *Nlrp6* en el riñón murino adulto sano y con la disminución de la expresión durante el FRA. En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución de la expresión renal de NLRP6 podría ser clínicamente relevante y que esta relevancia clínica podría extenderse a la ERC.

## 4.2. *Nlrp6* podría ser un gen nefroprotector en el FRA

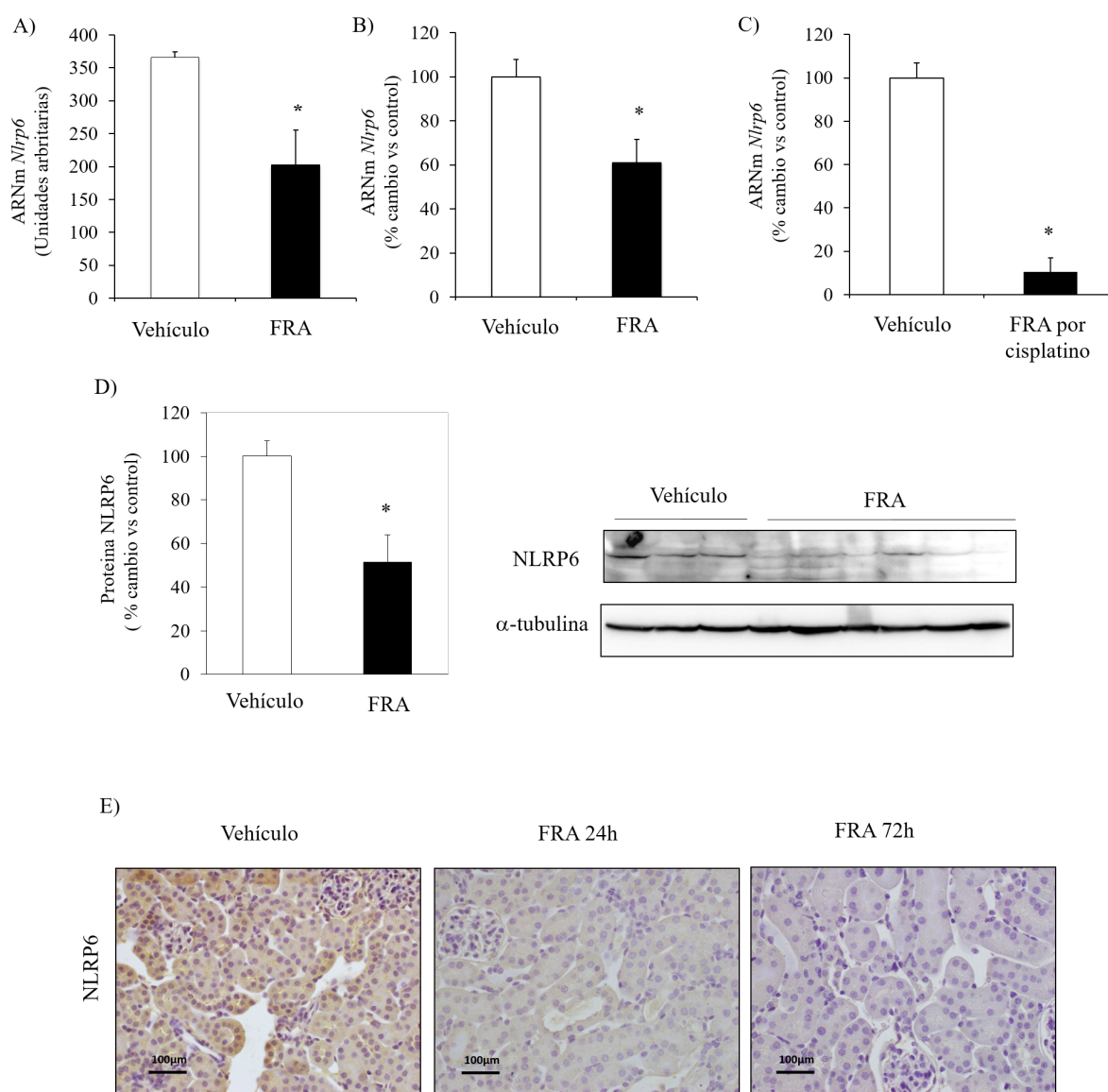
En primer lugar, abordamos la confirmación de los datos transcriptómicos en el FRA nefrotóxico experimental y el estudio de la función de NLRP6 en este modelo.

### 4.2.1. Priorización de *Nlrp6* para estudios detallados de su función durante el daño renal

Dada la alta expresión constitutiva, que sugiere una función en el riñón sano, la inesperada reducción de la expresión durante el FRA, que podría implicar un impacto sobre la patogenia del daño renal, la confirmación de que la expresión génica renal de *Nlrp6* está también disminuida en nefropatías humanas y el desconocimiento de la función de NLRP6 en el riñón, confirmada en varias búsquedas PubMed, en esta tesis nos hemos centrado en caracterizar la expresión y función de NLRP6 durante la lesión renal. Para ello, se han utilizado modelos experimentales murinos de FRA nefrotóxico y de ERC con fibrosis renal.

### 4.2.2. La expresión de NLRP6 en células tubulares renales disminuye durante el FRA nefrotóxico

El FRA inducido por la inyección de una sobredosis de ácido fólico comparte con el FRA humano un aumento de los niveles de creatinina sérica, muerte de células tubulares y la inflamación intersticial<sup>26</sup>. Mediante RT-QPCR confirmamos la observación transcriptómica de una reducción de alrededor del 40% en la expresión génica de *Nlrp6* en los riñones con FRA (Figura 12 A, B).

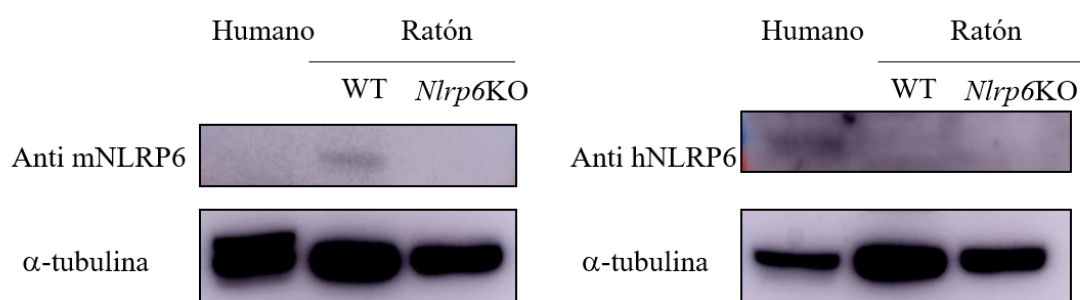


**Figura 12: Disminución de los niveles de expresión de ARNm y de proteína de NLRP6 renal en el FRA nefrotóxico en ratones WT.** Salvo que se indique lo contrario, FRA se refiere a FRA por sobredosis de ácido fólico. **A)** Resultados de la transcriptómica renal. Se estudió tejido renal de ratones con FRA y ratones control a las 24 horas tras la inyección de ácido fólico o del vehículo. **B)** Niveles de ARNm de *Nlrp6* renal evaluados por RT-QPCR 72 horas después de la inyección de ácido fólico o vehículo. \* $p < 0,009$  vs vehículo. **C)** Niveles de expresión renal de ARNm de *Nlrp6* medidos por RT-QPCR en ratones WT con FRA inducido por cisplatino a las 72 horas después de la inyección de cisplatino o vehículo. \* $p < 0,0001$  frente al vehículo. **D)** Niveles de Proteína NLRP6 renal medidos por Western Blot a las 72 h tras la inducción de FRA por ácido fólico. \* $p < 0.01$  frente al vehículo. **E)** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de NLRP6 en células tubulares a las 24 y 72 horas de la inyección del vehículo o ácido fólico. Ampliación original 20x, la barra de escala es de 100  $\mu$ m. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de  $n=3$  ratones (**A**: transcriptómica renal) o 6 ratones por grupo (**B-E**).

Además, los hallazgos transcriptómicos de la disminución de la expresión de *Nlrp6* durante el FRA, fueron validados otro modelo de FRA nefrotóxico, inducido por cisplatino (**Figura 12 C**). Finalmente, se confirmó la disminución de los niveles de

proteína a las 72 horas de la inducción del FRA (**Figura 12 D**) y mediante inmunohistoquímica, se localizó la expresión de NLRP6 en el citoplasma de las células epiteliales tubulares proximales (**Figura 12 E**).

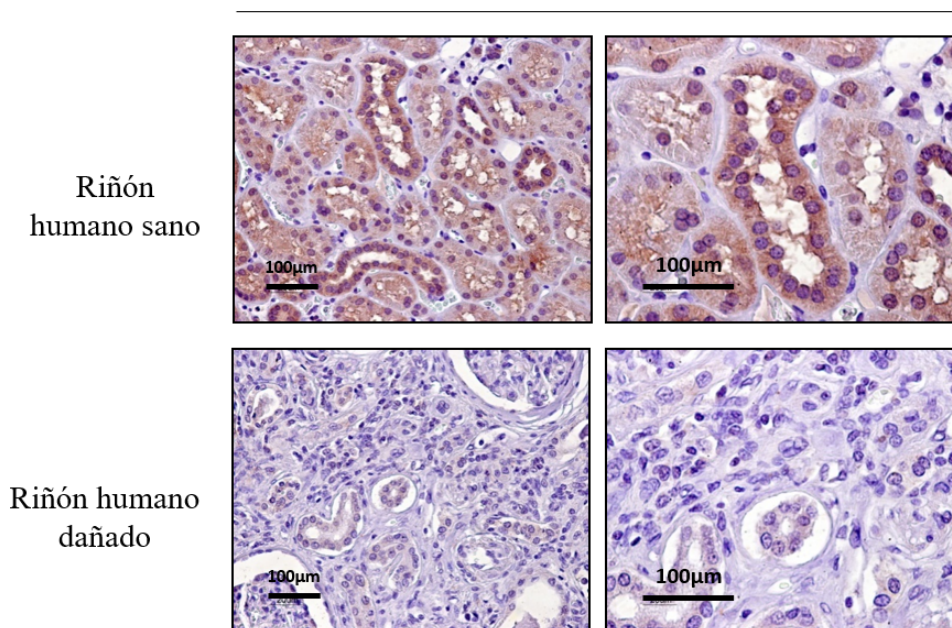
Mediante Western Blot se confirmó la presencia de una proteína del tamaño esperado de 96 kDa en riñón humano, utilizando un anticuerpo anti-NLRP6 humano, y una proteína de 96 kDa, que reacciona con anticuerpos anti-NLRP6 murino en riñón de ratones WT sanos, pero no en ratones *Nlrp6*KO (**Figura 13**). El anti-NLRP6 humano no reaccionó con el anti-NLRP6 murino y viceversa.



**Figura 13: NLRP6 se expresa en el riñón humano y murino normal.** Expresión proteica de NLRP6 en tejido de riñón humano y en tejido de riñón de murino aislado de ratones WT y de ratones *Nlrp6*KO. Western Blot. Representativo **A)** El anticuerpo anti-murino NLRP6 (Santa Cruz (E20): sc-50635) detecta NLRP6 en el riñón murino WT, pero no en ratones *Nlrp6*KO o en el riñón humano. **B)** El anticuerpo anti-humano NLRP6 (Santa Cruz (F20): sc23 50636) detecta una banda de NLRP6 de tamaño esperado en el riñón humano, pero no en el riñón murino.

La disminución de la expresión de NLRP6 en las células tubulares durante el FRA, también se observó en el FRA humano, lo que respalda la relevancia clínica potencial de estos hallazgos (**Figura 14**).

## NLRP6



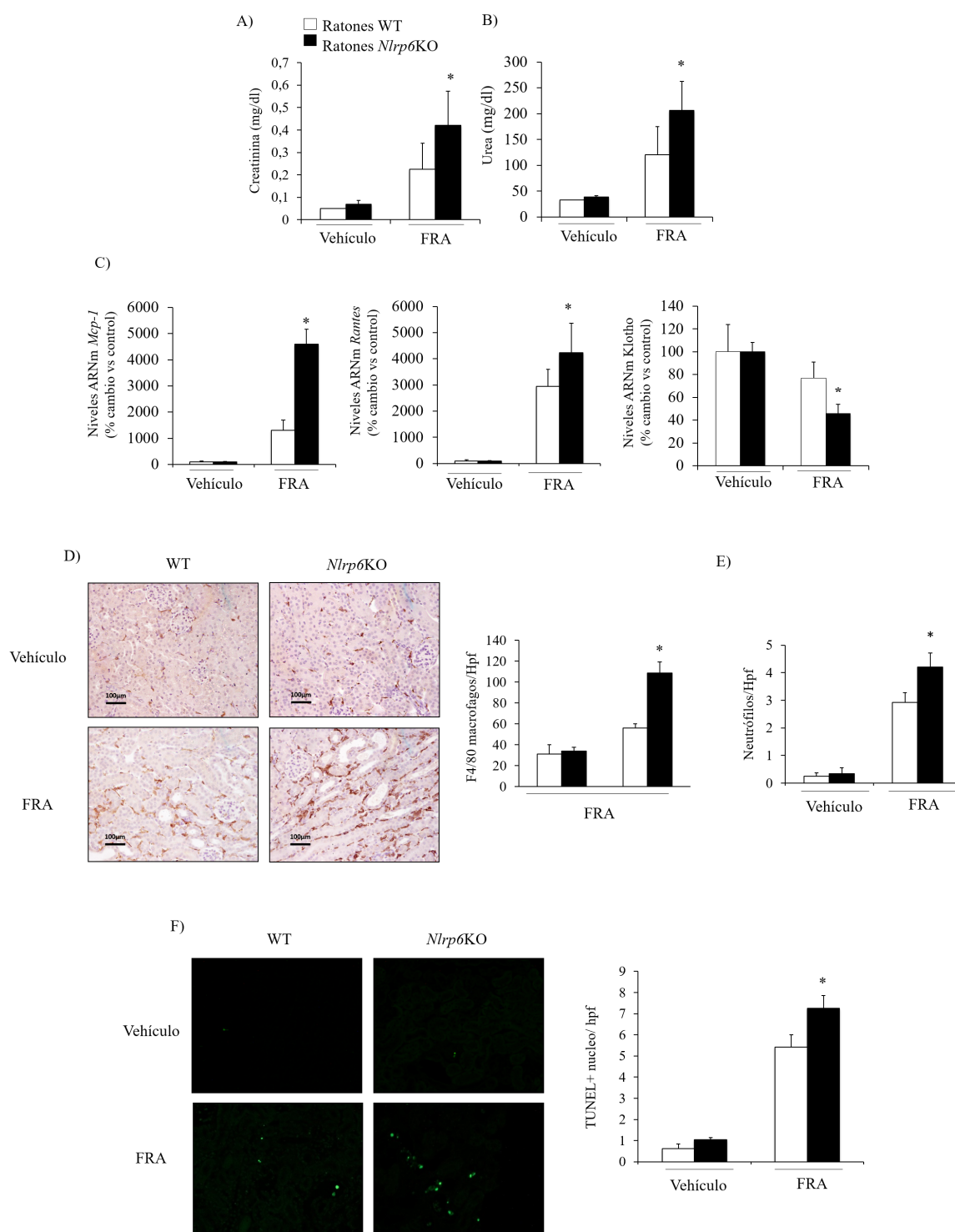
**Figura 14: NLRP6 se expresa en los túbulos renales humanos normales y disminuye durante la lesión renal.** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de muestras humanas sanas y con FRA. Ampliación original 20x (fotografías de la izquierda) y 40x (fotografías de la derecha), barra de escala 100 µm.

RE

#### 4.2.3. La deficiencia de *Nlrp6* aumenta la gravedad del FRA nefrotóxico

Dado que se observó una disminución de la expresión renal de NLRP6 en el FRA, nos centramos en las consecuencias de esta reducción. Para abordar el papel de *Nlrp6* en el FRA nefrotóxico inducido por fólico, utilizamos ratones *Nlrp6*KO<sup>147</sup> y sus hermanos de camada, “WT littermates”. Al inicio del estudio, los ratones *Nlrp6*KO parecían histológicamente iguales al resto y no diferían de los WT en cuanto a los niveles basales de expresión de quimiocinas, genes de la matriz extracelular o al número de macrófagos intersticiales y células positivas para la tinción TUNEL.



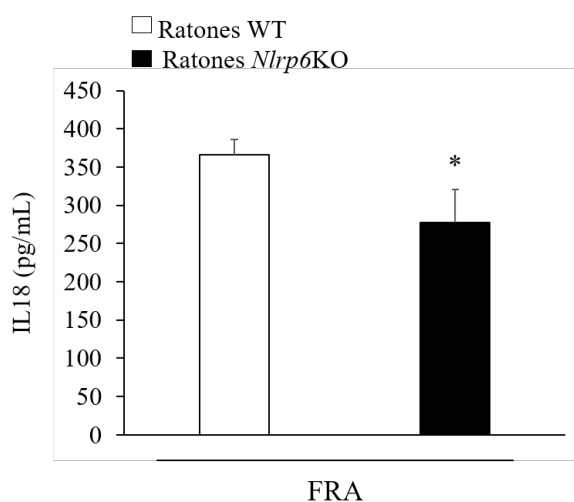


**Figura 15: La deficiencia de *Nlrp6* agrava el FRA inducido por ácido fólico. A)** Niveles de creatinina sérica \*  $p < 0,005$  frente a ratones WT con FRA. **B)** Niveles de urea sérica. \*  $p < 0,005$  frente a ratones WT con FRA **C)** Niveles de ARNm de las quimiocinas proinflamatorias *Mcp-1* y *Rantes* y del gen antiinflamatorio *Klotho* en ratones *Nlrp6KO* con FRA \*  $p < 0,05$  frente a ratones WT con FRA, medidos por RT-QPCR. **D)** Imágenes representativas y cuantificación de la tinción inmunohistoquímica del infiltrado de macrófagos F4/80 positivos \*  $p < 0,0001$  frente a ratones WT con FRA. **E)** cuantificación de la tinción inmunohistoquímica del infiltrado de neutrófilos de ratones *Nlrp6KO* \*  $p < 0,02$  frente a ratones WT con FRA. **F)** Imágenes representativa de la tinción por inmunofluorescencia TUNEL (verde) que muestra el ADN fragmentado, característico de la muerte celular de ratones *Nlrp6KO* con FRA \*  $p < 0,03$  vs WT con



FRA. **D) E) y F)** La cuantificación muestra el número de células positivas por campo, con un mínimo de 10 fotos por campo (hpf). La Ampliación original de 20x y la barra de escala es de 100  $\mu$ m. Los datos están representados como la media  $\pm$  EEM con una n=6 animales por grupo a las 72 horas tras la inducción del FRA.

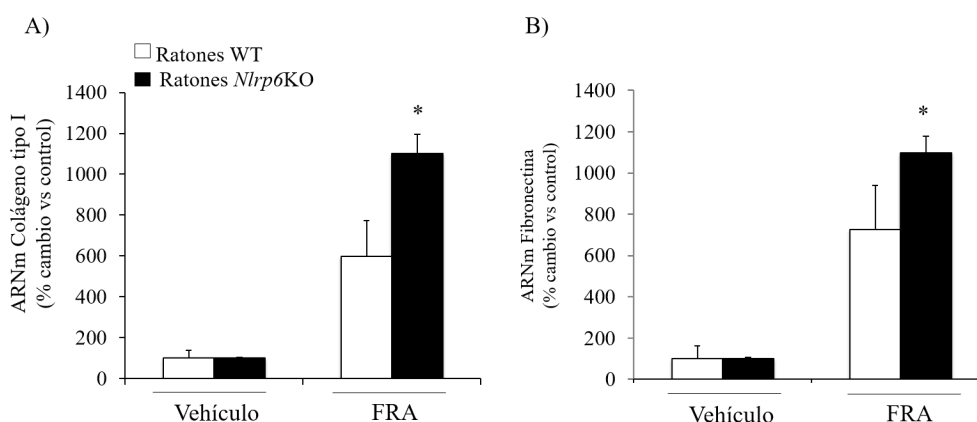
Sin embargo, los ratones deficientes para *Nlrp6* desarrollaban un FRA más grave, caracterizado por niveles más altos de creatinina sérica y urea, que son dos marcadores de función renal bien establecidos, que los ratones WT con FRA (**Figura 15 A, B**). Además, los ratones *Nlrp6*KO con FRA desarrollaban una mayor inflamación renal, caracterizada por unos mayores niveles de ARNm de quimiocinas proinflamatorias y una disminución de la expresión de genes antiinflamatorios (**Figura 15 C**) y también por una mayor infiltración de macrófagos intersticiales (**Figura 15 D**) y de neutrófilos (**Figura 15 E**), que los WT con FRA. Además, el número de células tubulares positivas para TUNEL, que tiñe células muertas, también era mayor en los *Nlrp6*KO con FRA que en los WT (**Figura 15 F**). La IL-18 es una citocina proinflamatoria que es procesada por la caspasa-1 tras la activación del inflammasoma<sup>247,248</sup> Las acciones protectoras de NLRP6 en el colon, durante la colitis requieren la regulación de la producción de IL-18<sup>147,149,150</sup>. En este sentido, tras la inducción del FRA los niveles plasmáticos de IL-18 fueron menores en los *Nlrp6*KO que en los WT (**Figura 16**).



**Figura 16: Los niveles séricos de IL-18 fueron más bajos en los *Nlrp6*KO que en los WT tras la inducción del FRA** Los niveles plasmáticos de IL-18 fueron medidos por ELISA \*p<0,05 frente a ratones WT con FRA. Los datos se expresaron como media  $\pm$  EEM de n=6 animales por grupo a las 72 horas tras la inyección del ácido fólico

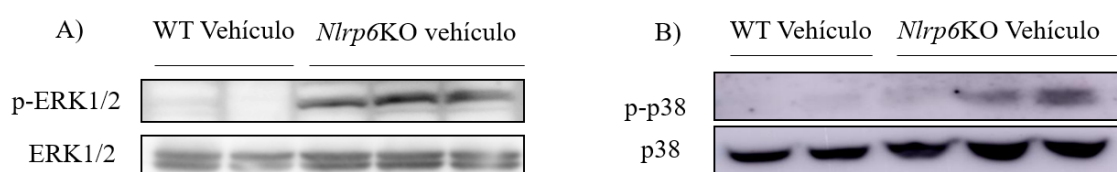
Pese a que no sea un modelo establecido de fibrosis, tal y como se ha indicado anteriormente, el FRA nefrotóxico puede dar lugar a una fibrosis leve. Se evaluaron los niveles de expresión de genes de la matriz extracelular, asociados al desarrollo de fibrosis, como fibronectina y colágeno tipo I, que estaban aumentados durante el FRA y este aumento fue más acusado en los *Nlrp6*KO que en los WT (**Figura 17**). Todos estos resultados, sugieren que la disminución en la expresión de NLRP6 durante el FRA,

conlleva a una amplificación de la respuesta inflamatoria y a un proceso de muerte celular, que podría conducir a la fibrosis renal.



**Figura 17:** La deficiencia de *Nlrp6* aumenta la expresión del ARNm que codifica para componentes de la matriz extracelular asociados a la fibrosis en el FRA inducido por ácido fólico. Los niveles de ARNm de colágeno tipo I **A)** y de fibronectina **B)** se midieron mediante RT-QPCR. \* $p < 0,05$  frente a ratones WT con FRA. Los datos se expresaron como media  $\pm$  EEM de  $n=6$  animales por grupo a las 72 horas tras la inyección del ácido fólico.

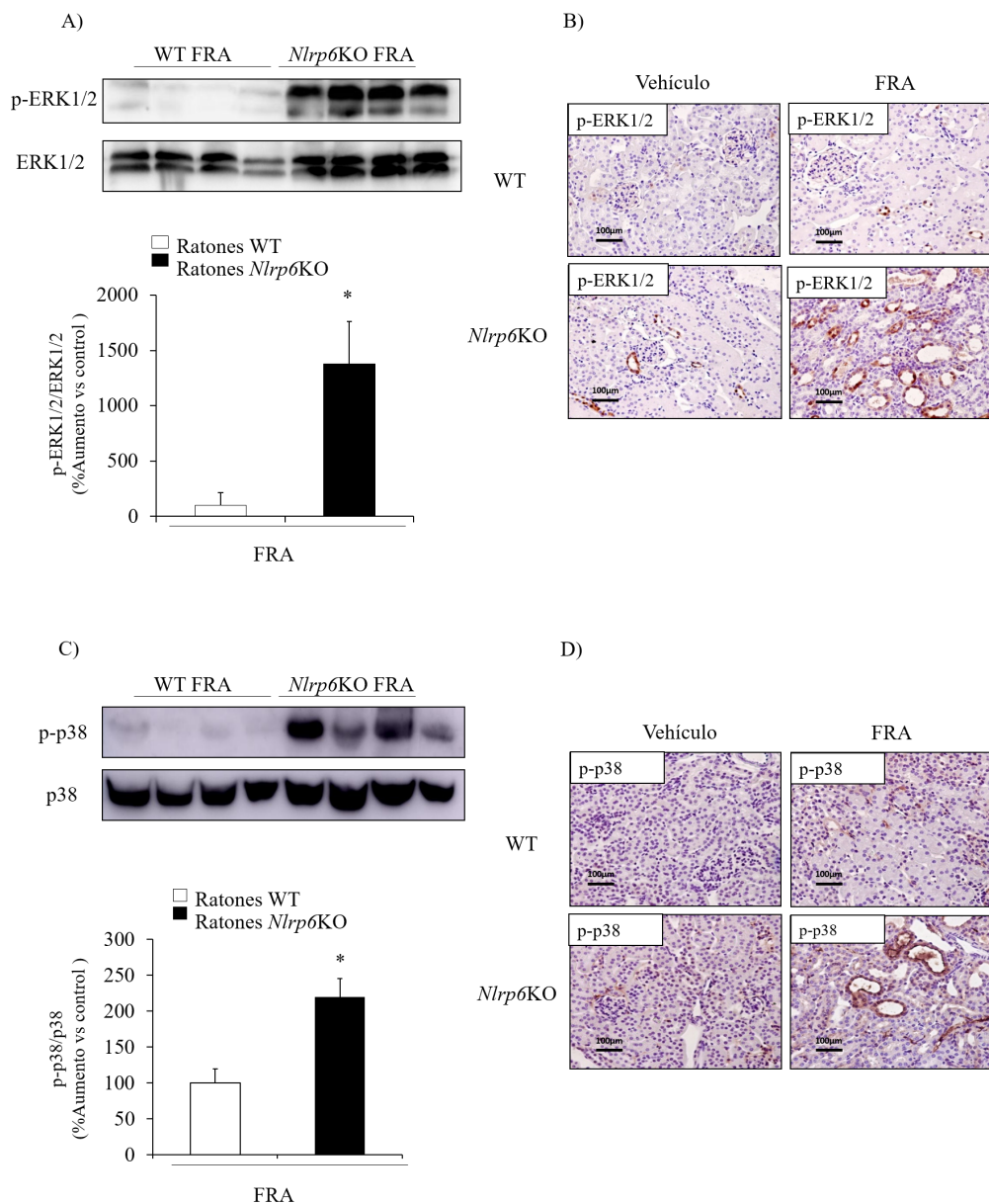
Se ha descrito que los ratones deficientes para *Nlrp6* muestran un aumento de la fosforilación (activación) de componentes de la vía de las MAPK, tras la lesión del nervio periférico y en leucocitos e hígado infectados por patógenos<sup>172,174</sup>. Por ello, exploramos si existían diferencias en la activación de ERK1/2 y p38 durante el daño renal. Observamos que ratones *Nlrp6*KO tenían, basalmente, una mayor activación de ERK1/2 y p38 que los WT (**Figura 18**).



**Figura 18** La deficiencia de *Nlrp6* aumenta los niveles constitutivos de ERK1/2 y p38 fosforilados en riñón. **A)** La fosforilación de ERK1/2 y **B)** La fosforilación de p38 se evaluó mediante Western Blot en extractos de riñones enteros en ratones *Nlrp6*KO y WT sanos a las 72 horas tras la inyección del fólico y del vehículo. Se emplearon  $n=6$  animales por grupo.

Tras la inducción del FRA, se vio que los niveles de fosforilación de ERK1/2 en los extractos de riñón completo, eran mayores en ratones *Nlrp6*KO que en los WT (**Figura 19 A**). Una observación similar se realizó para el p38 fosforilado. Durante el FRA, en el tejido renal los niveles de p38 fosforilado en de riñón completo también eran mayores

en los ratones *Nlrp6*KO, que en los WT (**Figura 19 C**). Mediante inmunohistoquímica se localizó este aumento de la fosforilación de ERK1/2 (**Figura 19 B**) y de p38 (**Figura 19 D**) en células tubulares, que son células renales clave, en las que se expresa el NLRP6 en los ratones WT.



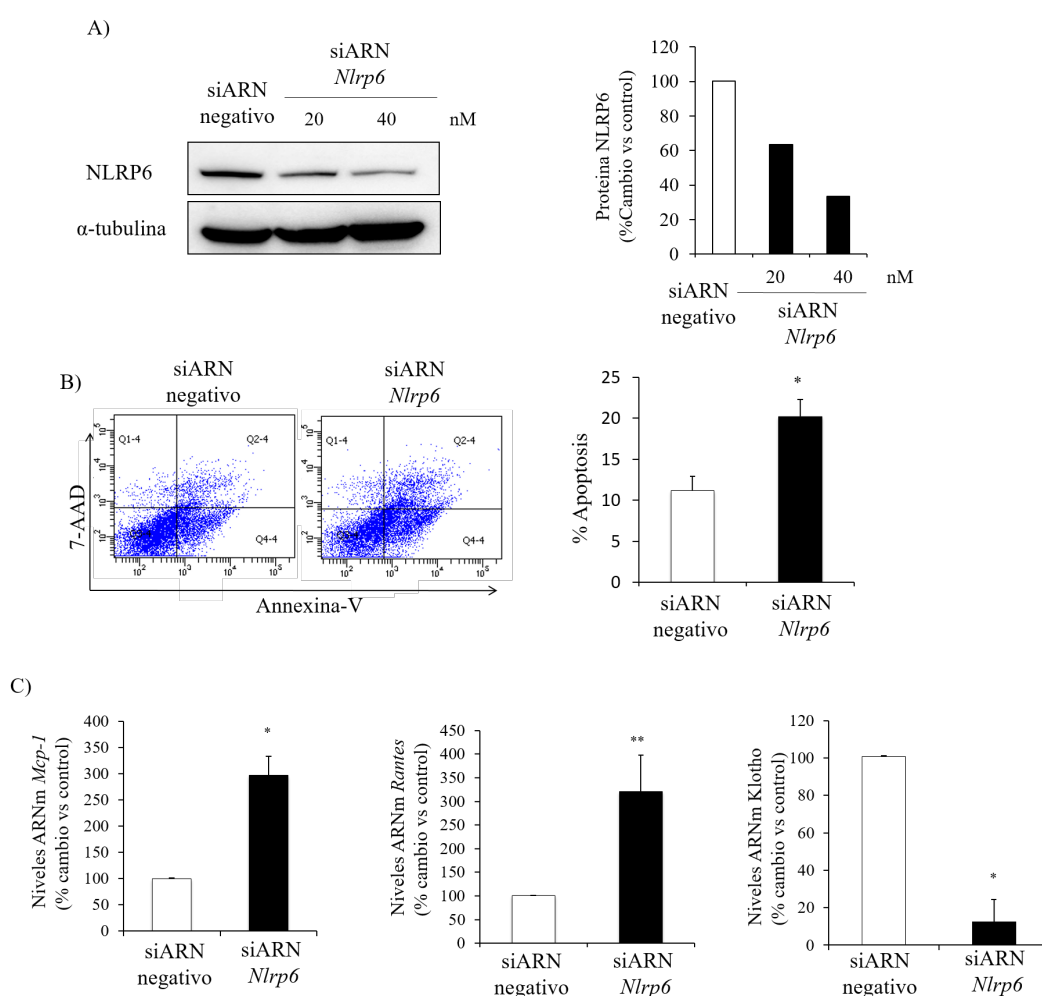
**Figura 19: La deficiencia de *Nlrp6* aumenta la fosforilación de ERK1/2 y p38 en el FRA inducido por ácido fólico.** **A)** La fosforilación de ERK1/2 y **C)** la fosforilación de p38 se evaluaron mediante Western Blot en extractos de riñón a las 72 horas tras la administración del ácido fólico o de vehículo. Se muestra imagen representativa del Western Blot y su cuantificación de los niveles de expresión de p-ERK1/2 y p-p38 de los ratones *Nlrp6*KO \* $p < 0,01$  frente a ratones WT. Imágenes representativas de la tinción por Inmunohistoquímica de **B)** fosforilación de ERK1/2 y **D)** fosforilación de p38 en células tubulares de ratones *Nlrp6*KO o WT sanos y con FRA. Ampliación original x20, la barra de escala 100  $\mu$ m. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de  $n=6$  animales por grupo a las 72 horas tras la inducción del FRA.

Puesto que la activación de ERK1/2 y p38 contribuye a la inflamación y lesión en el riñón<sup>249–255</sup>, estos resultados sugieren que la desregulación de la activación de la vía de

las MAPK podría contribuir al aumento de la sensibilidad de los ratones *Nlrp6*KO a la lesión renal.

#### 4.2.4. NLRP6 protege a las células tubulares de la apoptosis y disminuye las respuestas inflamatorias

Tras la observación de que la expresión de NLRP6 está disminuida en células tubulares en el FRA y de que la deficiencia de *Nlrp6* agrava la inflamación y muerte de células tubulares *in vivo*, se exploró la función de NLRP6 en células epiteliales tubulares murinas (MCT) *in vitro*.



**Figura 20: Caracterización funcional *in vitro* de las acciones de NLRP6 en células tubulares proximales.**

**A)** Imagen representativa y cuantificación de Western Blot de los niveles de expresión proteica de NLRP6, tras el silenciamiento de *Nlrp6* en MCT mediante siARNs específicos. **B)** Diagramas de citometría de flujo representativos de los niveles de apoptosis y la cuantificación de la muerte de células MCT tratadas con el siARN negativo \*p < 0.03 vs las células silenciadas. **C)** Medición de los niveles de ARNm de *Mcp-1* y *Rantes*, así como de *Klotho* por RT-QPCR, de las células tratadas con el siARN negativo, \*p < 0,004 y \*\*p < 0,05 frente a las células no silenciadas. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes con pocillos duplicados. Los experimentos fueron recogidos a las 48 horas tras el silenciamiento.

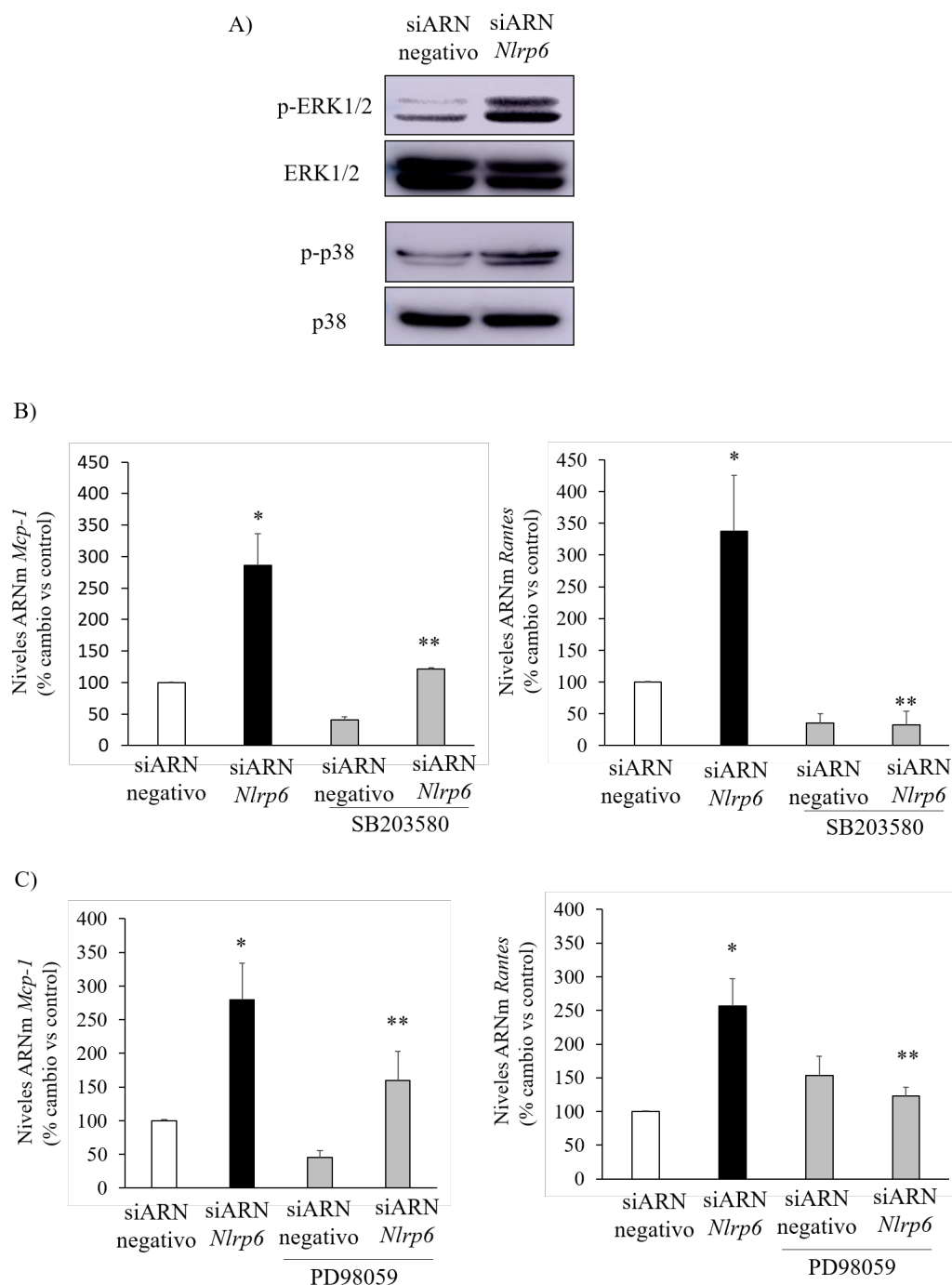
En estas células, se observó que el silenciamiento de *Nlrp6* mediante el empleo de siARNs específicos disminuyó la expresión de la proteína NLRP6 (**Figura 20 A**). La eliminación de los factores de supervivencia del suero bovino fetal (SBF) de los medios de cultivo celulares es un inductor clásico de muerte celular que ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo de investigación<sup>27</sup>. Estudios de citometría de flujo revelaron que el silenciamiento de *Nlrp6* aumentó la muerte celular en células tubulares desprovistas de suero (**Figura 20 B**). Además, observamos que el silenciamiento de *Nlrp6* amplificó respuestas inflamatorias previamente descritas como mediadas por la vía de NF- $\kappa$ B en células tubulares<sup>57,58</sup>, como el aumento de la expresión de dianas canónicas de NF- $\kappa$ B (quimiocinas proinflamatorias MCP1 y RANTES) y la disminución en la expresión del gen antiinflamatorio Klotho (**Figura 20 C**). Estos resultados obtenidos en cultivos celulares concuerdan con las observaciones *in vivo* en ratones *Nlrp6*KO y sugieren que la desregulación de las respuestas proinflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B y la mayor predisposición a la muerte de las células tubulares podrían contribuir al desarrollo de un FRA más grave.

#### 4.2.5. La respuesta inflamatoria producida por el silenciamiento de *Nlrp6* requiere la activación de la vía de las MAPK

RE A continuación, exploramos posibles mecanismos del aumento de respuestas inflamatorias en ausencia de *Nlrp6*. En concreto, exploramos el estado de la fosforilación de ERK1/2 y p38 en MCT silenciadas. El silenciamiento de *Nlrp6* con siARNs específicos causó un aumento de la fosforilación de ERK1/2 y p38 (**Figura 21 A**). Por lo tanto, el silenciamiento de *Nlrp6* en células tubulares cultivadas reprodujo los resultados observados *in vivo* de que la deficiencia de *Nlrp6* se asocia a un aumento de la activación de las MAPK durante el FRA.

Dado que se había descrito que el exceso de fosforilación de ERK1/2 o p38 contribuye a la inflamación renal<sup>249–255</sup>, evaluamos si la fosforilación de ERK1/2 o p38 era responsable del aumento en la expresión de los niveles de ARNm de quimiocinas proinflamatorias, observado en células deficientes para *Nlrp6*. El tratamiento de las células tubulares con un inhibidor específico de ERK1/2 (PD98059) (**Figura 21 B**) o de p38 (SB203580) (**Figura 21 C**), resultó en un aumento más leve de los niveles de ARNm de *Mcp-1* y *Rantes* tras el silenciamiento de *Nlrp6*.

Estos datos sugieren que el aumento de la respuesta inflamatoria tras la deficiencia *in vitro* de *Nlrp6* en las células tubulares murinas está mediado por una mayor activación de la vía de las MAPK.



**Figura 21: La deficiencia de *Nlrp6* en células tubulares proximales promueve *in vitro* la activación de MAPK. A)** Imagen representativa de los niveles de fosforilación de ERK1/2 y p38 evaluados por Western Blot, de células silenciadas con el siARN negativo y con siARNs específicos de *Nlrp6*. **B y C)** Niveles de expresión de ARNm medidos por RT-QPCR de *Mcp-1* y *Rantes* en células silenciadas para *Nlrp6*, pretratadas con el inhibidor de ERK1/2 (20  $\mu$ M PD98059) y de p38 (5  $\mu$ M SB203580). \*p <0,005 frente a las células tratadas con el siARN negativo, \*\*p <0,01 o frente a las células silenciadas con siARNs específicos de *Nlrp6* no tratadas con el inhibidor. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes con pocillos duplicados. Los experimentos fueron recogidos a las 48 horas tras el silenciamiento.

### 4.3. Caracterización del papel de NLRP6 durante la enfermedad renal crónica

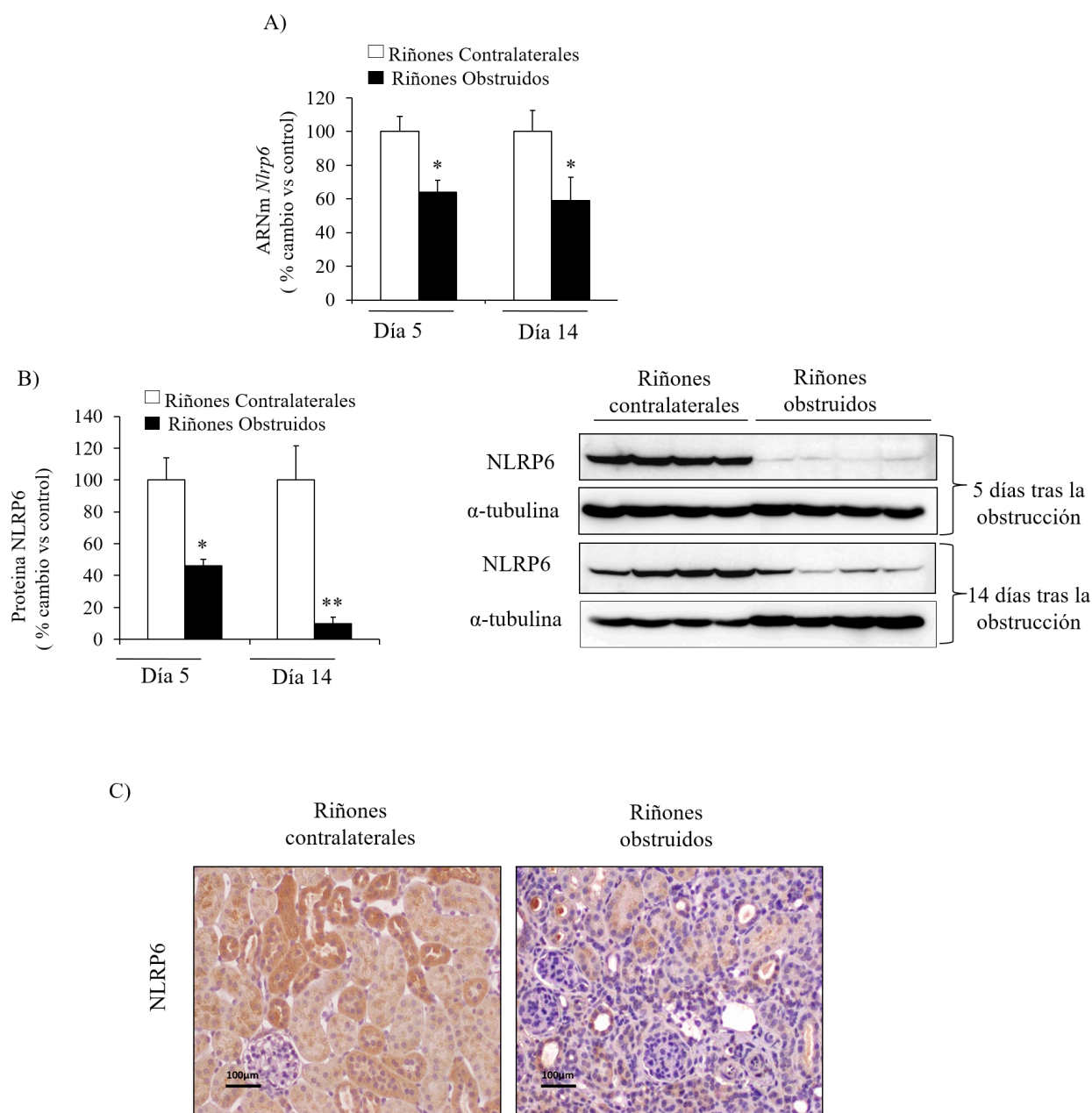
Tras observar que durante la ERC humana baja la expresión renal de ARNm de *NLRP6* y que esto se asocia con una TFGe más baja, se estudiaron los niveles de expresión y la función de NLRP6 en el modelo UUO, un modelo experimental bien caracterizado que reproduce características de la ERC humana, como la inflamación y fibrosis intersticial<sup>231,256</sup>.

#### 4.3.1. La expresión renal de NLRP6 disminuye durante la fibrosis experimental

En primer lugar, se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de *Nlrp6* tanto en los riñones obstruidos como en los riñones contralaterales, no obstruidos, a los 5 y 14 días tras la obstrucción.

Los niveles de ARNm de *Nlrp6* disminuyeron en los riñones obstruidos de ratones WT, en comparación con sus contralaterales (**Figura 22 A**). Mediante Western Blot, se confirmó la disminución de los niveles de proteína de NLRP6 en los riñones obstruidos a los 5 y 14 días en comparación con los riñones no obstruidos (**Figura 22 B**). La inmunohistoquímica localizó la pérdida de la expresión de NLRP6 en las células tubulares de los riñones obstruidos (**Figura 22 C**).



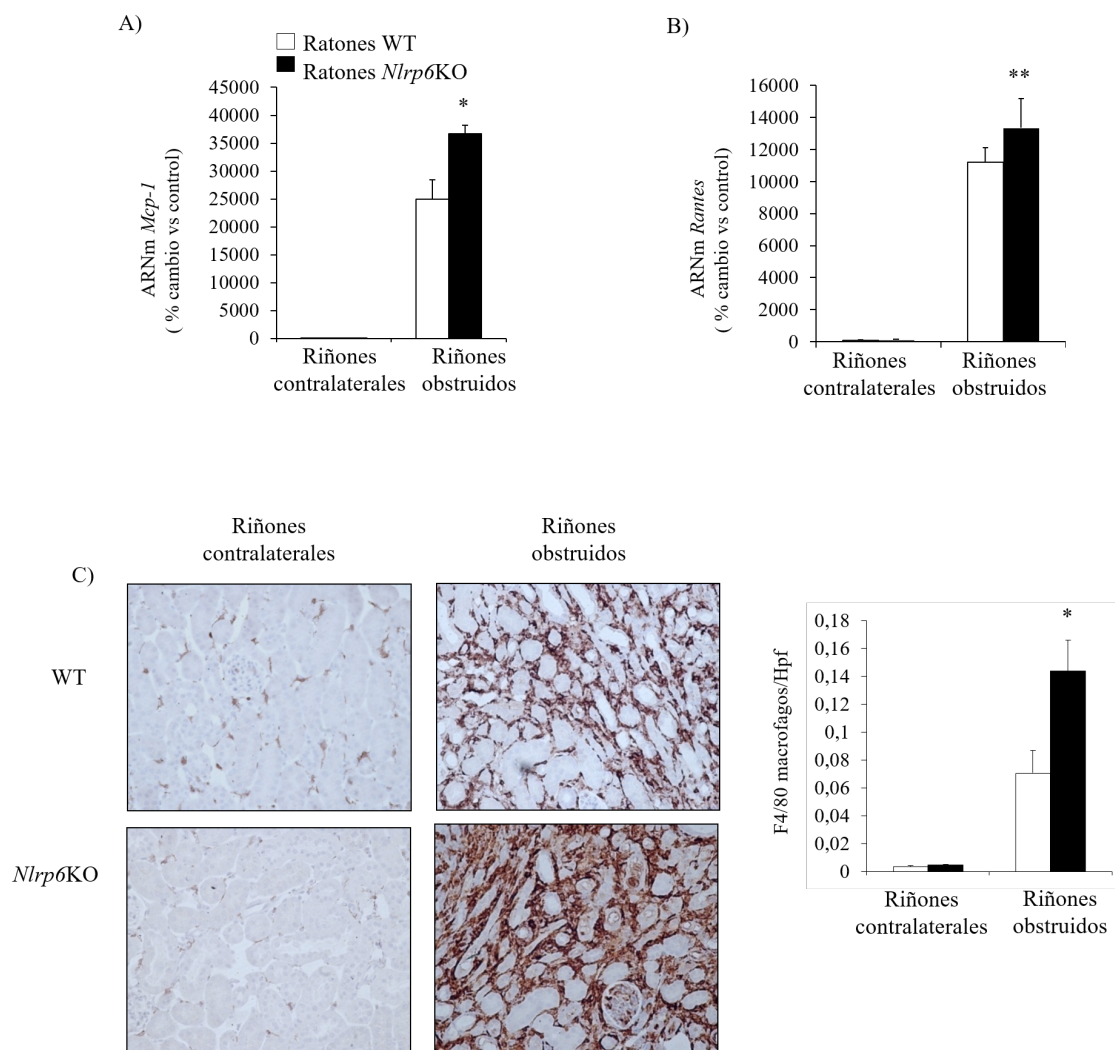


**Figura 22: La expresión del gen *Nlrp6* disminuye en los riñones obstruidos en comparación con los riñones contralaterales. A)** Los niveles de ARNm de *Nlrp6* se evaluaron por RT-QPCR \*p <0,005 obstruido frente a contralateral respectivo en los días 5 y 14 después de la obstrucción. **B)** Niveles de expresión de la proteína NLRP6 medidos por Western Blot \*p <0,005 obstruidos frente a contralaterales a día 5 tras la obstrucción o \*\*p <0,0001 obstruidos frente a contralaterales a día 14 tras la obstrucción. **C)** La disminución de NLRP6 en los túbulos renales fue confirmada por inmunohistoquímica, que la localizó en las células tubulares. Ampliación original 20x, barra de escala 100 μm. Los datos se expresaron como la media ± EEM de n=5 ratones por grupo a los 5 y 14 días tras la obstrucción.



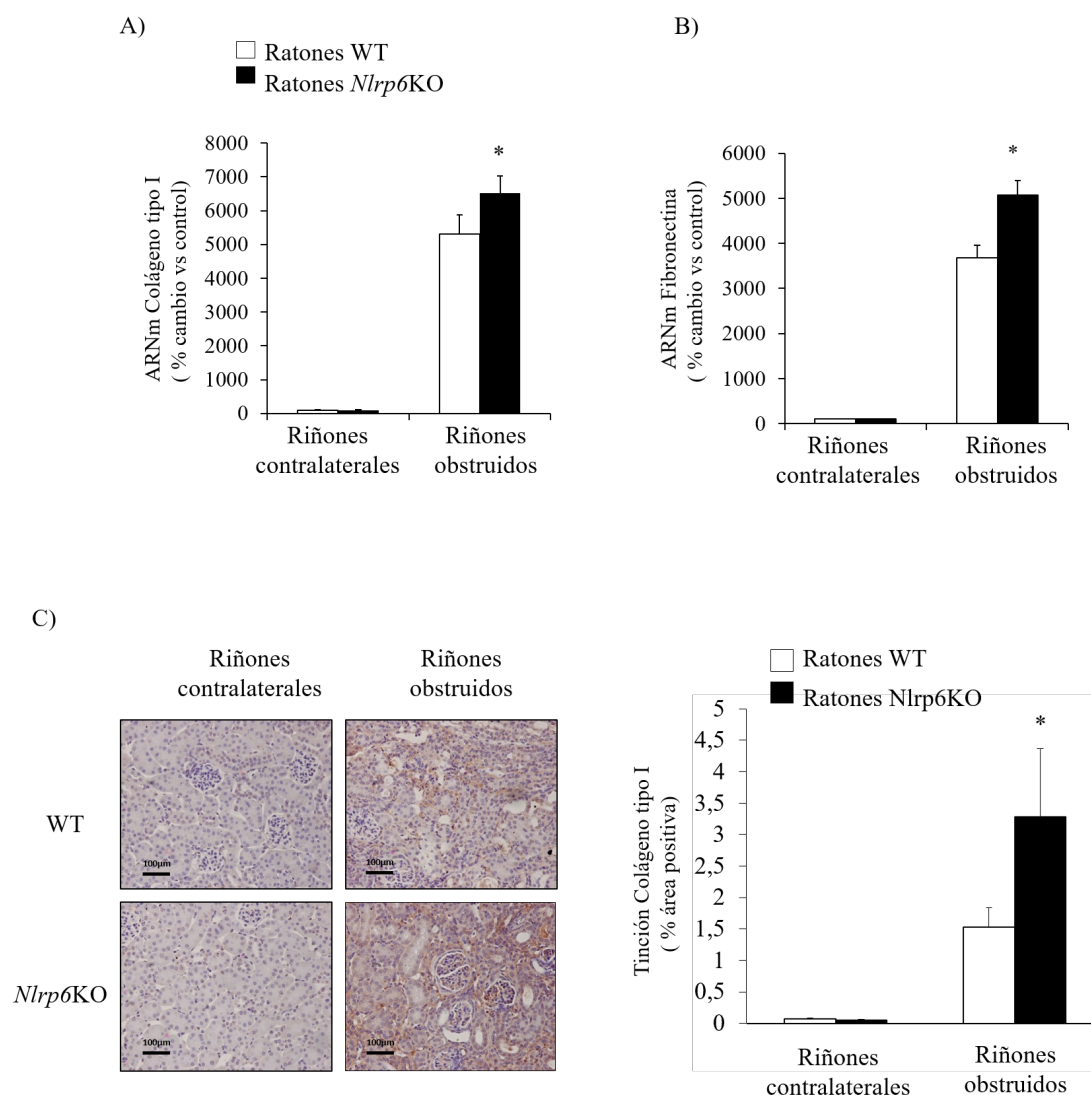
### 4.3.2. La deficiencia de *Nlrp6* agrava la inflamación y fibrosis durante la ERC experimental

Para evaluar la función de NLRP6 en la fibrosis renal, comparamos los riñones de ratones deficientes para *Nlrp6* con sus hermanos de camada, a los 14 días tras la obstrucción. Los ratones *Nlrp6*KO tenían una lesión renal más grave, incluyendo una mayor inflamación y fibrosis.



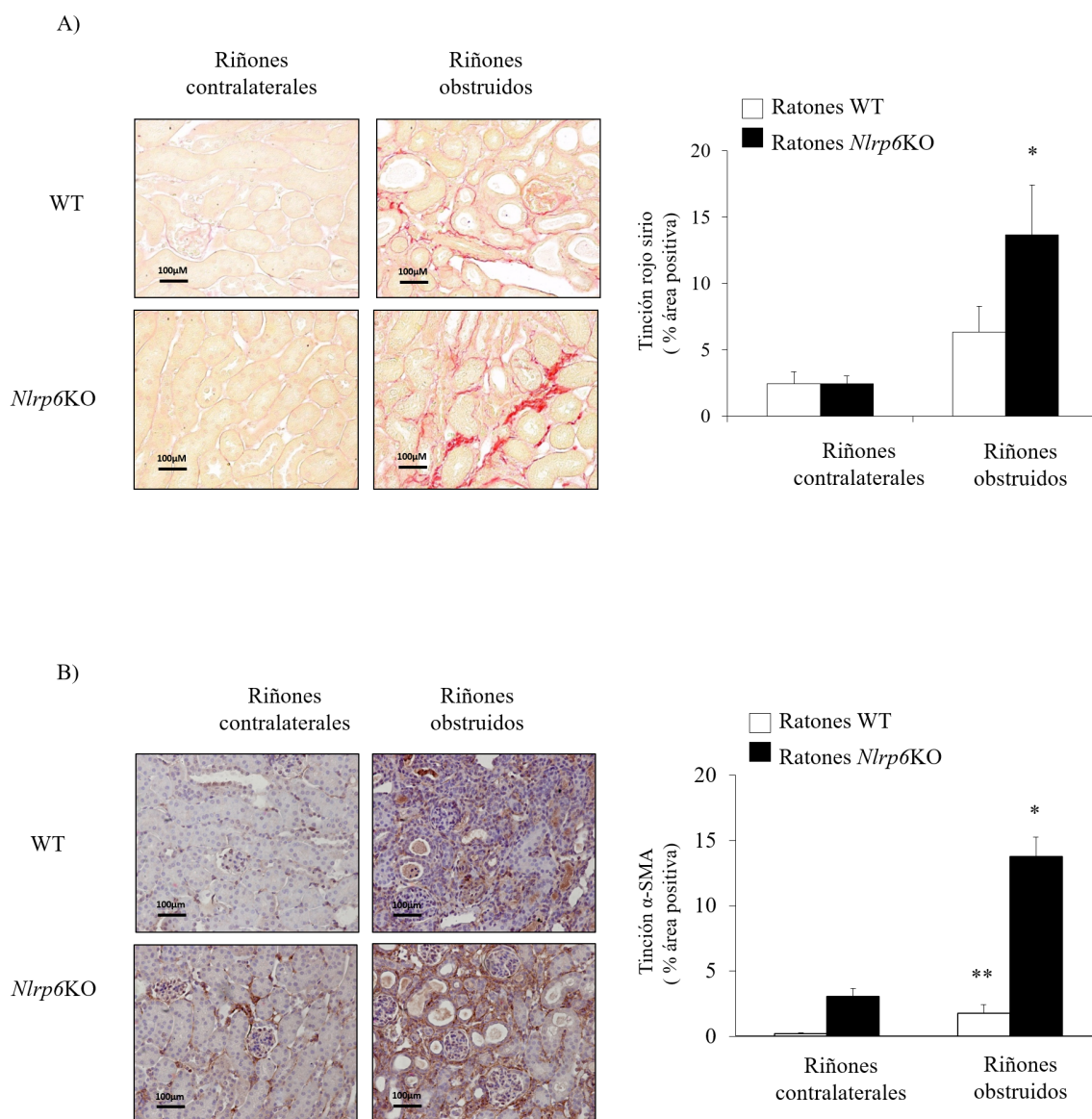
**Figura 23: La deficiencia de *Nlrp6* se asocia a una inflamación más grave tras la obstrucción.** Se muestran los niveles de ARNm de **A)** *Mcp-1* y **B)** de *Rantes* medidos por RT-QPCR tras la obstrucción en ratones *Nlrp6*KO y WT. \* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,05$  frente a ratones WT. Los riñones obstruidos se compararon con su respectivo riñón contralateral, no obstruido, para cada ratón, a los que se asignó el valor de 100%. **C)** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica del infiltrado de macrófagos F4/80 positivo. La cuantificación muestra el número de células positivas por campo, contabilizadas en un mínimo de 10 fotos por campo. *Nlrp6*KO \* $p < 0,02$  frente a ratones WT tras la obstrucción. La ampliación original fue de 20x, barra de escala 100  $\mu$ m. Los datos se muestran como media  $\pm$  EEM de  $n=5$  ratones por grupo a los 14 días después de la obstrucción.

La deficiencia de *Nlrp6* se asoció a un aumento de los niveles de ARNm de las quimiocinas proinflamatorias, *Mcp-1* y *Rantes*, tras la obstrucción (**Figura 23 A, B**). MCP-1 y RANTES reclutan macrófagos a los lugares de lesión tisular<sup>257</sup> y de acuerdo con estos datos, los estudios de inmunohistoquímica revelaron una mayor infiltración intersticial de macrófagos F4/80 positivos en los riñones obstruidos de los ratones *Nlrp6*KO que en los WT, 14 días después de la obstrucción (**Figura 23 C**).



**Figura 24:** La deficiencia de *Nlrp6* se asocia a una mayor expresión de genes que codifican matriz extracelular y a mayor depósito de colágeno tipo I tras la obstrucción. Se muestran los niveles de ARNm de **A)** Colágeno tipo I y **B)** de fibronectina medidos por RT-QPCR tras la obstrucción de ratones *Nlrp6*KO y WT. \* $p < 0,05$  frente a ratones WT obstruidos. Los riñones obstruidos se compararon con su respectivo riñón contralateral, no obstruido, para cada ratón, a los que se asignó el valor de 100%. **C)** Los niveles de proteína de colágeno I también fueron evaluados inmunohistoquímicamente y se cuantificaron con el software Image-Pro Plus en un mínimo de 10 fotos por ratón *Nlrp6*KO y WT \* $p < 0,042$  frente a ratones WT tras la obstrucción. La ampliación original fue de x20, barra de escala 100  $\mu$ m. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM de  $n=5$  ratones por grupo a los 14 días después de la obstrucción.

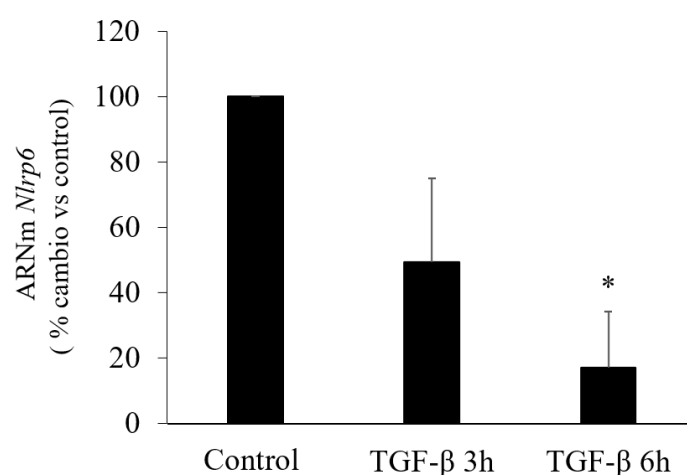
Los niveles de ARNm de genes asociados a la fibrosis, como el colágeno tipo I y fibronectina, también fueron significativamente mayores en los riñones obstruidos de los *Nlrp6*KO que en los riñones obstruidos de los WT (**Figura 24 A, B**). La mayor expresión de colágeno tipo I intersticial tras la obstrucción fue confirmada por inmunohistoquímica (**Figura 24 C**).



**Figura 25: La deficiencia de *Nlrp6* se asocia a una fibrosis más grave tras la obstrucción. A)** La acumulación total de colágeno fue evaluada por la tinción con rojo sirio en ratones *Nlrp6*KO y WT. \* $p < 0,0005$  frente a ratones WT tras la obstrucción. **B)** Los niveles de  $\alpha$ -SMA fueron evaluados por inmunohistoquímica en ratones *Nlrp6*KO y WT \* $p < 0,0001$  frente a ratones WT tras la obstrucción y \* $p < 0,033$  frente al riñón contralateral WT. La cuantificación fue realizada con el software Image-Pro Plus en un mínimo de 10 fotos por ratón. La ampliación original fue de x20, barra de escala 100  $\mu$ m. Los datos se expresaron como media  $\pm$  SEM de  $n=5$  ratones por grupo a los 14 días después de la obstrucción.

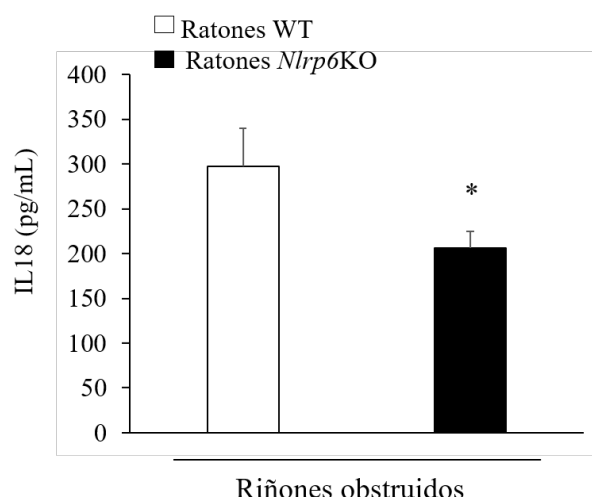
En este sentido, la tinción con rojo sirio objetivó un mayor depósito de colágeno intersticial tras la obstrucción en ratones *Nlrp6*KO que en ratones WT (**Figura 25 A**). Los niveles de  $\alpha$ -SMA, una proteína expresada por miofibroblastos y altamente asociada a la respuesta fibrótica<sup>62</sup>, también fueron más altos tras la obstrucción en los ratones *Nlrp6*KO que en los WT. De hecho, basalmente, los ratones deficientes para *Nlrp6* mostraban unos niveles más altos de  $\alpha$ -SMA que los WT (**Figura 25 B**).

A continuación, buscamos potenciales mediadores de la disminución de expresión de *Nlrp6* en un ambiente profibrótico *in vitro* en células MCT. El estímulo de las células tubulares renales con el factor profibrótico TGF- $\beta$ 1, que tiene un papel fundamental como mediador de la fibrosis renal<sup>258,259</sup>, disminuyó los niveles ARNm de *Nlrp6* en comparación con las células no estimuladas (**Figura 26**). Estos resultados sugieren que NLRP6 puede disminuir en respuesta a un ambiente profibrótico y a su vez, contribuir a la acumulación de la matriz extracelular en la fibrosis renal progresiva, durante la ERC experimental.



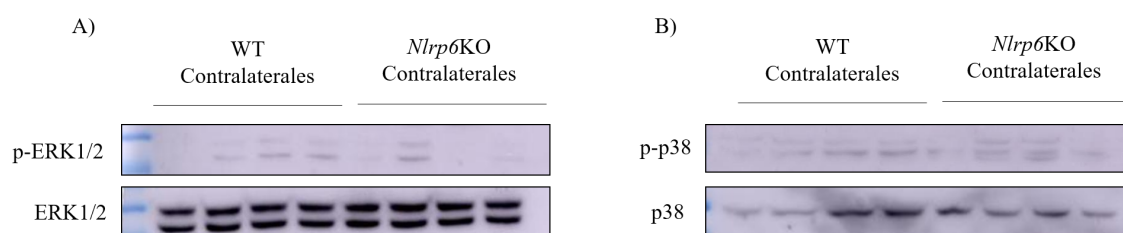
**Figura 26: TGF $\beta$ 1 disminuye los niveles de expresión de *Nlrp6*.** Los niveles de ARNm de *Nlrp6* medidos por RT-QPCR en células tubulares murinas tras el estímulo con 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 \* $p < 0,016$  frente a las células control, no estimuladas. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. Los experimentos fueron recogidos a las 3 y 6 horas tras el estímulo.

Sin embargo, la citocina proinflamatoria IL-18, que se procesa tras la activación del inflamasoma, no parece contribuir a este proceso, ya que los niveles plasmáticos de IL-18 fueron menores en ratones *Nlrp6*KO que en los WT, tras la obstrucción (**Figura 27**).



**Figura 27: Los niveles séricos de IL-18 fueron más bajos en los *Nlrp6*KO que en los WT tras la obstrucción** Los niveles plasmáticos de IL-18 se midieron por ELISA \* $p < 0,05$  frente a ratones WT obstruidos. Los datos se expresaron como media  $\pm$  EEM de  $n = 5$  animales por grupo a los 14 días tras la obstrucción.

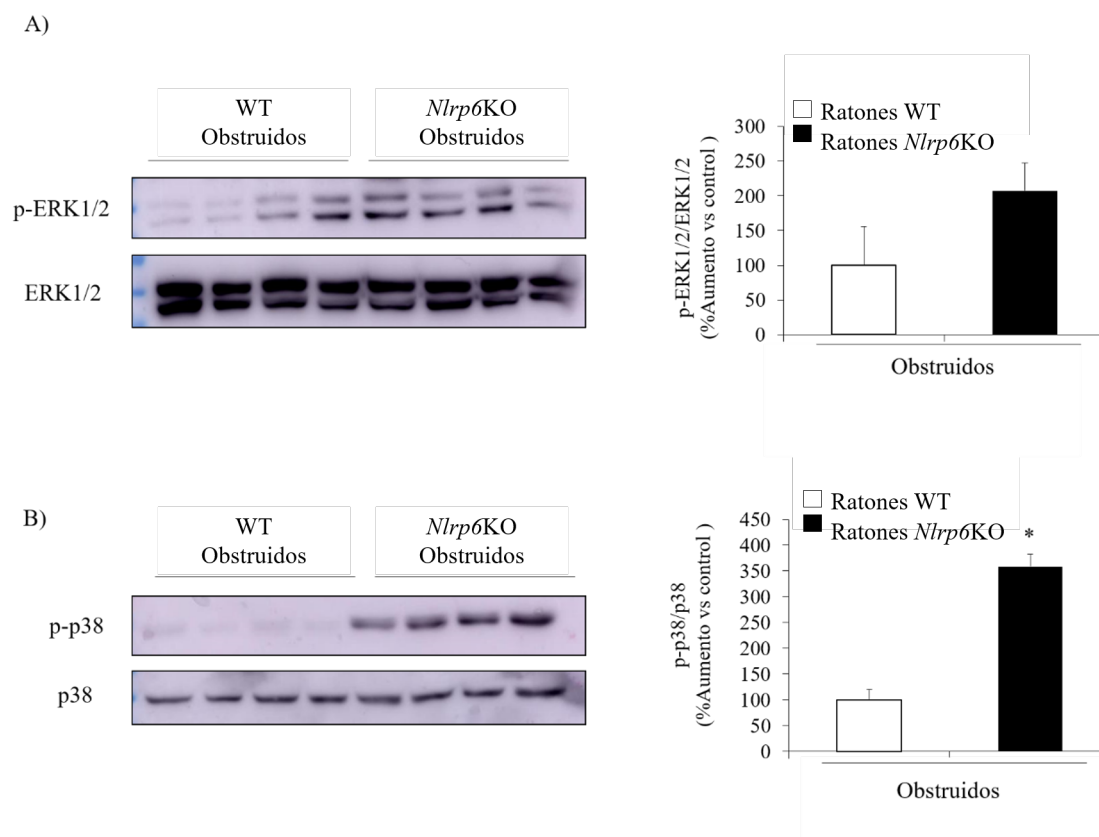
En el modelo del FRA nefrotóxico, habíamos observado diferencias en los niveles de activación basales de MAPK de los ratones *Nlrp6*KO y los WT inyectados con el vehículo (**Figura 18**). Sin embargo, en el modelo experimental del UUO, observamos basalmente una activación de la vía de las MAPK, pero no vimos diferencias de fosforilación ni de ERK1/2 (**Figura 28 A**) ni de p38 (**Figura 28 B**) entre los riñones contralaterales de los WT y *Nlrp6*KO. Cabe destacar, que los riñones contralaterales, utilizados como control, al contrario que los riñones controles empleados en el FRA, sufren cambios metabólicos, celulares y sobre todo, compensatorios de la función renal tras la obstrucción<sup>260</sup>, lo que podría afectar a la activación de la vía de las MAPK.



**Figura 28: No se observaron diferencias en el estado de activación (fosforilación) de ERK1/2 y p38 entre los riñones contralaterales de los ratones WT y *Nlrp6*KO** A) La fosforilación de ERK1/2 y B) La fosforilación de p38 se evaluó mediante Western Blot en extractos de riñones enteros en ratones *Nlrp6*KO y WT contralaterales, 14 días tras la obstrucción. Se estudiaron  $n=5$  animales por grupo.

En contraposición con lo observado en los riñones contralaterales, la deficiencia de *Nlrp6* se asoció a un aumento de los niveles de fosforilación de ERK1/2 (**Figura 29 A**) y

de p38 en los riñones obstruidos (**Figura 29 B**), si bien en el caso de p-ERK1/2, este aumento no resultó ser significativo. Estos resultados sugieren que la desregulación de la activación de la vía de las MAPK, y en concreto, de la activación de p38, inducida por la deficiencia de *Nlrp6*, podría ser uno de los factores ligados a una mayor progresión de la fibrosis, durante la ERC experimental, ya que la literatura muestra un papel de p38 en la fibrosis renal<sup>261</sup>.



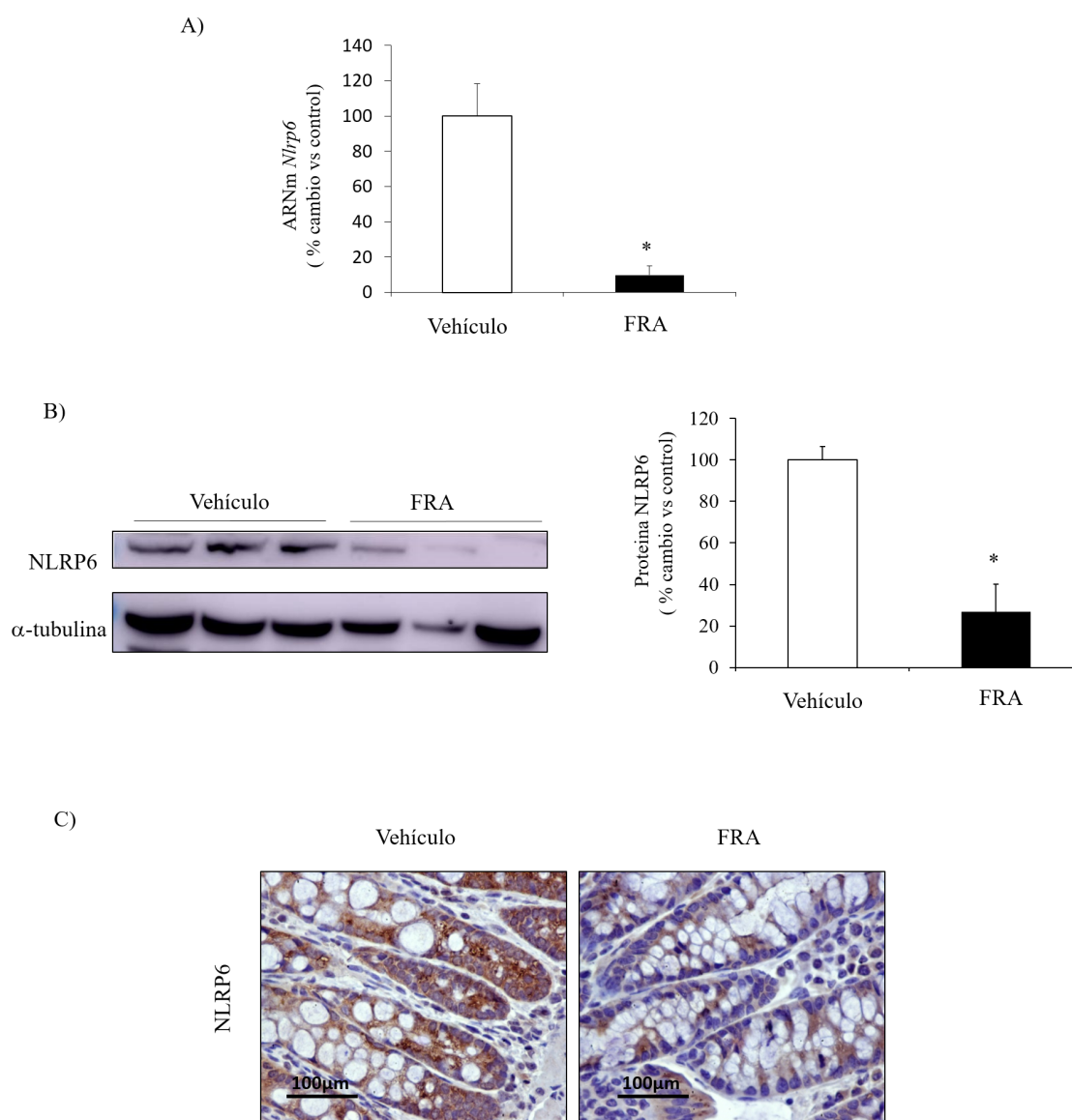
**Figura 29: La deficiencia de *Nlrp6* se asocia a una mayor fosforilación de ERK1/2 y p38 tras la obstrucción durante la ERC experimental. A)** La fosforilación de ERK1/2 y **B)** la fosforilación de p38 se evaluaron mediante Western Blot en extractos de riñón a los 14 días tras la obstrucción. Se muestra imagen representativa del Western Blot y su cuantificación para p-ERK1/2 (no significativo) y p-p38 de los ratones *Nlrp6*KO y WT. \* $p < 0,0001$  frente a ratones WT tras la obstrucción. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de  $n=5$  animales por grupo.



#### 4.4. Expresión *in vivo* de NLRP6 en el intestino tras el daño renal

Tal y como se ha indicado anteriormente NLRP6 está altamente expresado en el tracto gastrointestinal y en concreto, en células intestinales específicas del colon como los enterocitos y las células caliciformes. En diversos modelos experimentales murinos se ha descrito su papel protector de NLRP6 en estas células, contribuyendo a mantener la barrera intestinal, regulando la secreción de mucus necesaria para la defensa frente a patógenos y también previniendo la colitis y la tumorigénesis asociada a inflamación<sup>147,149,150,152</sup>. Se ha sugerido un papel clave para la modelación de la microbiota intestinal en estos fenómenos, papel que no podría jugar en el riñón, donde hay un ambiente estéril. Sin embargo, recientemente se ha puesto en duda la función reguladora de la microbiota<sup>170,262,263</sup>. Como la enfermedad renal se ha asociado a disfunción de múltiples órganos y en concreto, hay una interacción con la microbiota intestinal, de tal manera que la microbiota intestinal se altera en la enfermedad renal y a su vez, la microbiota sintetiza precursores de toxinas urémicas que contribuyen a la progresión de la enfermedad renal y a la patología cardiovascular de la enfermedad renal, abordamos la hipótesis de que la expresión intestinal de NLRP6 podría modificarse durante el daño renal.

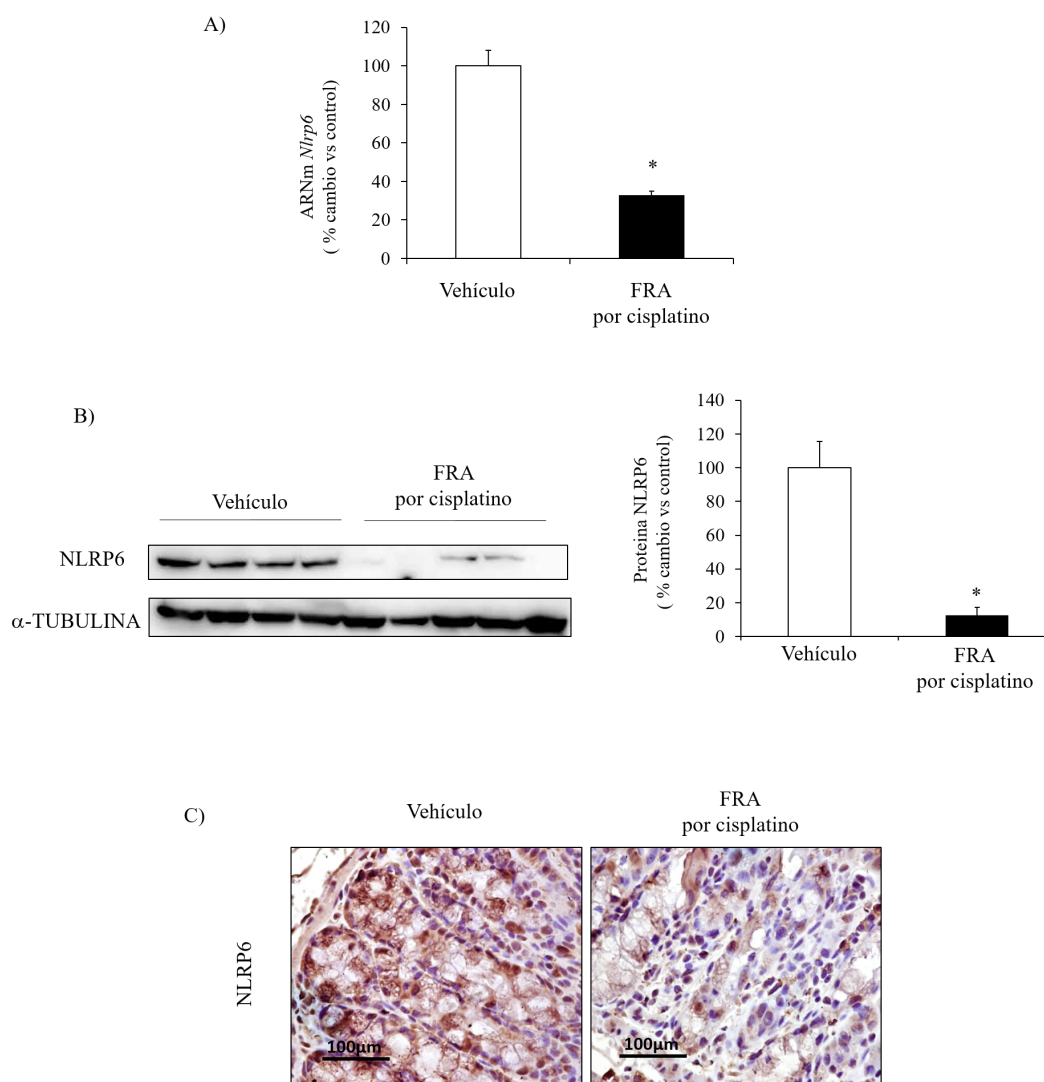
Para ello se exploró *in vivo* los niveles de expresión de NLRP6 en el colon de ratones durante el FRA inducido por ácido fólico. Se observó que los niveles de ARNm de *Nlrp6* estaban disminuidos en el colon, tras la inducción del FRA nefrotóxico por sobredosis de ácido fólico (**Figura 30 A**). Además, mediante Western Blot también se confirmó la disminución de los niveles de proteína de NLRP6 tras el FRA (**Figura 30 B**). Mediante inmunohistoquímica, se localizó esta disminución en las criptas de Lieberkühn, en las que se encuentran células caliciformes y enterocitos, entre otras, en las cuales se había descrito el papel protector de NLRP6 frente a la lesión intestinal (**Figura 30 C**).



**Figura 30: Disminución de los niveles de expresión de ARNm y de proteína de NLRP6 el colon en un modelo experimental de FRA por inyección de ácido fólico en ratones WT** **A)** Niveles de ARNm de *Nlrp6* medidos por RT-QPCR en ratones WT con FRA inducido por ácido fólico \*p <0,009 frente al vehículo. **B)** niveles de proteína de NLRP6 del riñón medidos por Western Blot tras el FRA. Se muestra una imagen representativa del Western Blot y la cuantificación de los niveles proteicos de NLRP6 \*p <0.008 frente al vehículo. **C)** La inmunohistoquímica localizó la disminución de la expresión de NLRP6 en las criptas de Lieberkühn. Ampliación original 20x y la barra de escala es de 100μm. Los datos se expresaron como la media ± EEM de n=6 ratones a las 72 horas tras la inyección del ácido fólico o vehículo.

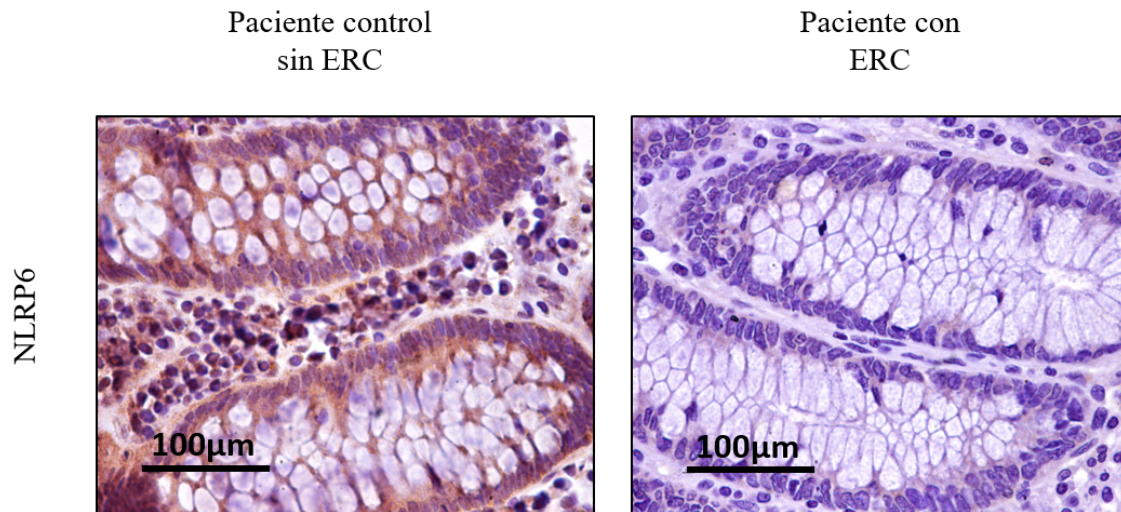
Además, para comprobar que esta disminución de los niveles de expresión de NLRP6 en el colon eran debido al FRA y no a las acciones del ácido fólico, se exploraron los niveles de NLRP6 en otro modelo experimental de FRA, inducido por cisplatino, en el cual se obtuvieron los mismos resultados (**Figura 31 A, B y C**).





**Figura 31: Disminución de la expresión de ARNm y de proteína de NLRP6 el colon en un modelo experimental de FRA por inyección de cisplatino en ratones WT. A)** Niveles de ARNm de *Nlrp6* medidos por RT-QPCR en ratones WT con FRA inducido por cisplatino \* $p < 0,0001$  frente al vehículo. **B)** niveles de proteína de NLRP6 renal medidos por Western Blot tras el FRA. Se muestra una imagen representativa del Western Blot y la cuantificación de los niveles proteicos de NLRP6 \* $p < 0.001$  frente al vehículo. **C)** La inmunohistoquímica localizó la disminución de la expresión de NLRP6 en las criptas de Lieberkühn. Ampliación original 20x, barra de escala 100  $\mu\text{m}$ . Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de  $n=6$  ratones a las 72h tras la inyección del cisplatino o vehículo.

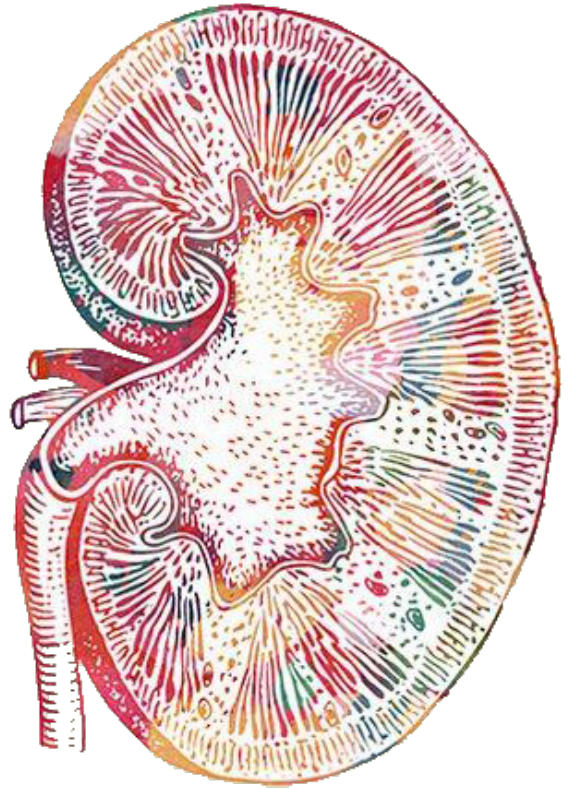
Además, estos resultados de la disminución de los niveles NLRP6 en el colon tras el daño renal, fueron corroborados por inmunohistoquímica en muestras de colon humanas de pacientes con ERC (**Figura 32**).



**Figura 32: La expresión de NLRP6 disminuye en el tracto intestinal en pacientes con ERC.** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de colon de muestras humanas sanas y de pacientes con ERC. Ampliación original a 20x, barra de escala 100 µm.

Todos estos resultados sugieren un posible eje de regulación entre la inducción del daño renal y la disminución de niveles de NLRP6 en el tracto gastrointestinal.

# Discusión



*“Si supiese qué es lo que estoy haciendo,  
no lo llamaría investigación, ¿Verdad?”*

*ALBERT EINSTEIN*

## 5. DISCUSIÓN

El FRA presenta una elevada mortalidad en torno al 50 %<sup>4</sup>. El problema principal es que no existe un tratamiento efectivo ni para recuperar la función renal, ni para prevenir su progresión a ERC. Además, los ensayos clínicos basados en la experimentación animal sobre fármacos para tratar el FRA han fallado, por lo que sólo queda recurrir a la diálisis y al trasplante, cuya implantación se produjo ya en los años 50 y no se ha conseguido desde entonces una terapia alternativa. Cabe destacar, que a día de hoy todavía existe una gran brecha entre los avances en investigación básica y su implementación en la clínica a la hora de tratar de preservar la salud renal, así como una brecha entre los avances clínicos y su posibilidad de implementación en la comunidad a nivel mundial, debido a factores socioeconómicos<sup>8</sup>. Hasta ahora, la mayor parte de aproximaciones científicas se han basado en tratar de disminuir los posibles factores lesivos que puedan contribuir a la progresión del FRA. Sin embargo, a lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral, se ha propuesto un nuevo abordaje novedoso, para abordar la enfermedad renal, aumentando los posibles factores nefroprotectores.

### 5.1. NLRP6 se expresa en el riñón sano y tiene un papel nefroprotector durante el FRA

En este trabajo hemos identificado, mediante transcriptómica, *Nlrp6*, como el gen de la familia de los NLR que más se expresa en condiciones basales en los riñones sanos murinos y el que más disminuye tras el FRA experimental. Esta disminución se ha localizado, en concreto, en las células tubulares tanto en el FRA nefrotóxico experimental, como en muestras humanas. Los experimentos con ratones y células deficientes para *Nlrp6*, sugieren que la expresión de NLRP6 por parte de las células tubulares renales es necesario para atenuar la respuesta inflamatoria en un ambiente estéril y para preservar la expresión de moléculas nefroprotectoras, como Klotho. En este sentido, la deficiencia de *Nlrp6* produjo un FRA nefrotóxico más grave.

Este posible papel como factor protector de NLRP6 durante el daño renal parece similar al observado en el epitelio intestinal dónde parece contribuir a mantener la homeostasis. La mayor parte de acciones de NLRP6 han sido descritas en el tracto gastrointestinal, dónde se está altamente expresado<sup>149,151,152</sup>. El tracto gastrointestinal alberga una gran cantidad de microorganismos comensales, tanto virus como bacterias, que constituyen la microbiota<sup>149</sup>. NLRP6 parece ser un modulador clave en la interacción entre la microbiota y la mucosa intestinal, la cual constituye la barrera intestinal. Ante una lesión en el intestino, los niveles de expresión de NLRP6 disminuyen y aumenta la susceptibilidad al desarrollo de la inflamación crónica y

desarrollo de carcinogénesis<sup>147</sup>. En estos procesos se había sugerido un papel crucial de la microbiota, ya que se describió que una alteración de la misma puede promover la secreción de quimiocinas proinflamatorias por parte de las células epiteliales intestinales<sup>148</sup>. De hecho, hay evidencias que indican que una microbiota anormal podría, por si misma, disminuir los niveles de expresión de NLRP6 a través de metabolitos específicos, asociados a la microbiota como la taurina<sup>153</sup>. Además, existen algunos estudios que indican que la disbiosis producida como consecuencia de la deficiencia de *Nlrp6* en ratones podría ser transferible, ya que ratones WT que cohabitaron con ratones deficientes para *Nlrp6* desarrollaban alteraciones en la microbiota e inflamación intestinal<sup>149</sup>. Pese a esta literatura inicial que relacionaba la deficiencia de *Nlrp6* con la disbiosis, estudios recientes han cuestionado el papel de NLRP6 en la modulación de la microbiota intestinal<sup>170,262,263</sup>.

Entre las funciones de NLRP6 en el intestino, destaca su papel en la regulación de la secreción de mucus por células caliciformes. En efecto, NLRP6 dirige la exocitosis de gránulos de mucina por las células caliciformes y la secreción de péptidos antibacterianos. Esto hace que los ratones deficientes para *Nlrp6* tengan dificultades para eliminar ciertos patógenos entéricos y sean más susceptibles a la infección<sup>152,163</sup>. En todo este proceso parece ser clave la formación del inflamasoma, puesto que la maduración y liberación de IL-18 intestinal como consecuencia de la activación del inflamasoma por la microbiota es dependiente de NLRP6<sup>153</sup>.

Sin embargo, este papel protector descrito para NLRP6 en el tracto gastrointestinal, no puede extrapolarse directamente al riñón, ya que éste es un órgano estéril, donde no hay células secretoras de mucus, ni microbiota capaz de inducir la secreción de quimiocinas por parte de las células epiteliales, por lo que otros mecanismos alternativos deben participar también en la protección tisular por NLRP6.

Los estudios iniciales acerca de NLRP6 se centraron en el intestino, puesto que se observó unos altos niveles de la proteína, aunque también se ha descrito su expresión proteica en el hígado<sup>14</sup>. Sin embargo, los anticuerpos anti-NLRP6 no habían sido probados exhaustivamente y el tiempo de exposición del Western Blot durante el proceso de revelado no dejaba claro su expresión más allá del intestino o del hígado. En el desarrollo de esta tesis doctoral, los resultados obtenidos mediante transcriptómica, acerca de expresión de NLRP6 en tejido renal sano murino fueron corroborados mediante Western Blot e inmunohistoquímica utilizando diferentes anticuerpos tanto anti-humano como anti-murino frente a NLRP6. Además, se localizó su expresión en células epiteliales tubulares en condiciones basales.

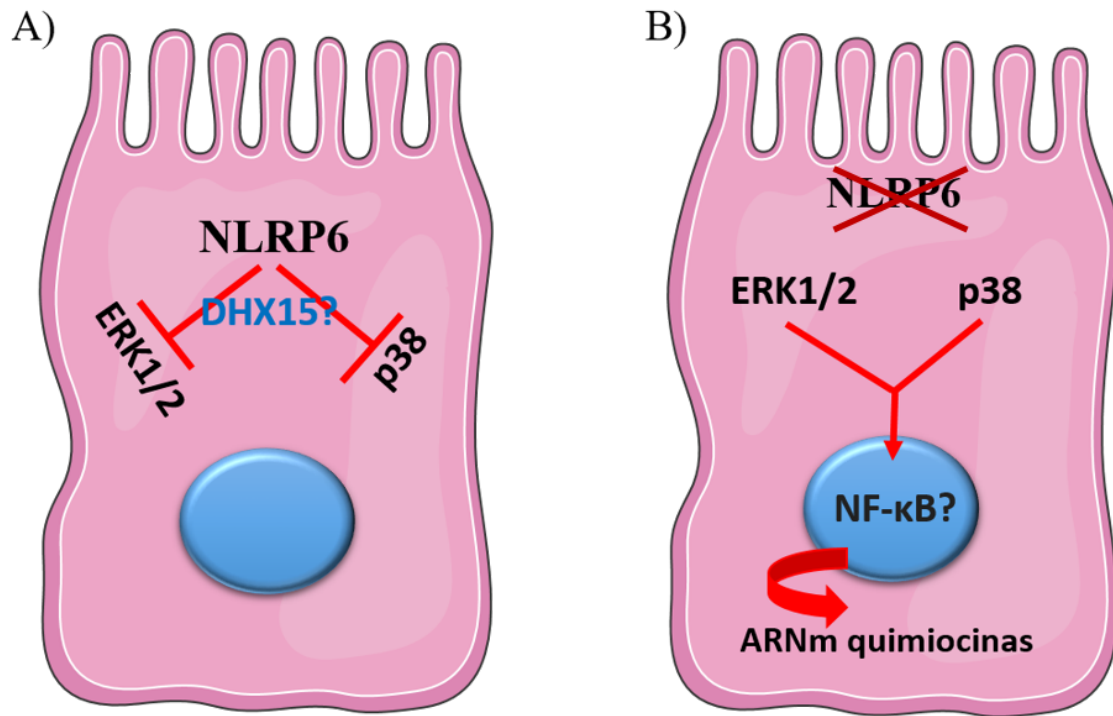
En el FRA, la deficiencia de *Nlrp6* da lugar a un aumento de la muerte de las células tubulares y a una mayor respuesta inflamatoria que los WT. Además, las consecuencias

del impacto negativo de la deficiencia de *Nlrp6* en el FRA, podrían no limitarse sólo a su etapa inicial, sino que podrían mantenerse a lo largo del tiempo. La deficiencia de *Nlrp6* en el riñón durante el FRA se asoció a una mayor activación de mecanismos fibrogénicos, con un aumento de la expresión de genes de matriz extracelular asociados a fibrosis, como colágeno tipo I y fibronectina.

Se había descrito un papel de NLRP6 en la regulación vía de NF- $\kappa$ B y de las MAPK en células mieloides. Además, la deficiencia de *Nlrp6* promueve la activación y aumento en la expresión de citocinas y quimiocinas diana de la vía canónica de NF- $\kappa$ B y de la vía de las MAPK, de manera TLR-dependiente, en leucocitos infectados en cultivo<sup>172</sup>. En nuestros estudios observamos en ratones deficientes para *Nlrp6* una activación espontánea de la vía de las MAPK en las células tubulares renales *in vivo* que aumentó por encima de los ratones WT durante el FRA. Hipotetizamos que la activación de la vía de las MAPK producida por la deficiencia de *Nlrp6* pudo contribuir a una mayor respuesta inflamatoria tras la inducción del daño renal. En este sentido y apoyando esta hipótesis, en estudios *in vitro* en células tubulares murinas, se observó como la deficiencia de *Nlrp6* reproduce las observaciones hechas *in vivo* de un aumento de la activación de las MAPK, un aumento de la respuesta inflamatoria, con el consecuente aumento de la expresión de quimiocinas proinflamatorias, una menor expresión del gen nefroprotector Klotho y una mayor tasa de muerte celular. La inhibición de ERK1/2 o p38 previno la respuesta inflamatoria exacerbada, sugiriendo un papel causal de estas MAPK en la mayor respuesta inflamatoria observada en células renales deficientes en *Nlrp6* o en las que la expresión de *Nlrp6* había sido suprimida. Estos resultados, concuerdan con el conocido papel perjudicial de la activación de ERK1/2 y p38 en la inflamación, la fibrosis y la lesión renal<sup>249–255</sup>.

Una limitación de esta tesis es que no hemos desentrañado la conexión molecular entre deficiencia de *Nlrp6* y activación de MAPK. De hecho, tampoco se ha desentrañado en otras estirpes celulares. Sin embargo, recientemente se ha descrito una proteína que podría servir de vínculo entre NLRP6 y la activación de la vía de las MAPK<sup>175</sup>. NLRP6 se une a la helicasa DHX15, la cual tiene un papel clave en la defensa antiviral, de manera independiente de la activación del inflamasoma<sup>175</sup>. La helicasa DHX15 activa las vías de NF- $\kappa$ B y MAPK<sup>265</sup>, inhibe la muerte celular<sup>266</sup> y además, se expresa en células tubulares renales<sup>267</sup>. Ésta y otras moléculas similares, podrían ser el enlace entre NLRP6 y sus efectos protectores durante el daño renal (**Figura 33 A**), aunque son necesarios estudios de intervención sobre la expresión o actividad de esta molécula para corroborar esta hipótesis.





**Figura 33: Mecanismo hipotético de nefroprotección llevado por NLRP6 durante el FRA. A)** Posible vínculo entre NLRP6 y DHX15 para la activación de la vía de las MAPK. **B)** Posible papel de la vía de NF-κB en este proceso. Los resultados obtenidos con inhibidores de quinasas en células cultivadas son compatibles con la hipótesis de que la activación de MAPK activa, a su vez, el factor de transcripción vía de NF-κB , que aumenta la expresión de quimiocinas proinflamatorias.

D

Nuestro grupo ha demostrado previamente que durante el FRA experimental, el aumento de la expresión de las quimiocinas proinflamatorias *Rantes* y *Mcp-1* y la disminución del gen nefroprotector *Klotho*, están mediadas por el factor de transcripción NF-κB , en células tubulares<sup>57,202</sup>. Por lo tanto, hipotetizamos, en base a los resultados obtenidos en células cultivadas, que la vía de las MAPK activaría NF-κB , que sería responsable de cambios similares observados en células tubulares en las que se suprimió *Nlrp6* y exacerbados en ratones con deficiencia de *Nlrp6* y FRA (**Figura 33 B**).

El ligando o los estímulos que modificarían la expresión de NLRP6 durante el FRA experimental son todavía desconocidos. La citocina proinflamatoria TWEAK es capaz de activar tanto la vía canónica como la no-canónica NF-κB y también es una molécula clave en el desarrollo del FRA. En efecto, TWEAK reproduce muchas de las anomalías observadas durante FRA a nivel de expresión génica, incluyendo aumento de la expresión de genes proinflamatorios y una disminución de la expresión de *Klotho*<sup>268–270</sup>. Por lo tanto, TWEAK podría ser un candidato a disminuir la expresión de NLRP6. Sin embargo, en experimentos no mostrados en esta tesis doctoral, observamos que TWEAK no disminuye la expresión génica de *Nlrp6* en células tubulares murinas

cultivadas. Queda abierta, pues, la identificación de los factores que suprimen la expresión de NLRP6, que podrían ser factores ambientales y/o intracelulares, que podrían actuar tanto sobre la transcripción como sobre la vida media del ARNm de *Nlrp6*. Entre los candidatos, que podrían ser considerados dianas terapéuticas para intentar evitar que disminuya la expresión de NLRP6, están los micro-ARNs (miARNs)<sup>271,272</sup>.

Existe otro antecedente de protección tisular por NLRP6 en un ambiente estéril: NLRP6 tiene un efecto beneficioso en la recuperación de la lesión de los nervios periféricos. Estudios de intervención parecidos a los presentados en esta tesis también sugirieron que la protección estaba mediada por la regulación negativa de la activación de la vía de las MAPK. Sin embargo, estas acciones protectoras resultaron independientes de la activación del inflamasoma, ya que la deficiencia *in vivo* de otros componentes del inflamasoma como la proteína adaptadora *Asc*, o las caspasas-1 y 11, así como la deficiencia de otros miembros de la familia de los NLR, como el componente del inflamasoma clásico de NLRP3, no revertía estas acciones protectoras<sup>174</sup>. Durante la inflamación intestinal, las acciones protectoras de NLRP6 son mediadas por la liberación de IL-18<sup>147,149,150</sup>, que requiere la activación del inflamasoma. Los niveles de IL-18 están aumentados durante el FRA experimental y podrían representar un biomarcador temprano de la lesión renal aguda<sup>35</sup>. En un modelo experimental de FRA por isquemia-reperfusión se ha visto que ratones deficientes para *Il-18* presentaban una mejor función renal, menor daño tubular, menor acumulación de neutrófilos y macrófagos y una menor expresión de moléculas proinflamatorias<sup>273</sup>. En este sentido, nosotros observamos que los niveles de IL-18 tras el FRA experimental por ácido fólico, eran menores en los *Nlrp6*KO que en los WT, por lo que no podemos descartar que IL-18 pueda contribuir al efecto protector tisular de NLRP6. Sin embargo, en el desarrollo de esta tesis no hemos empleado ratones deficientes en otros componentes del inflamasoma, otros NLR o *Il-18*, por lo que no hemos caracterizado su papel en la nefroprotección por NLRP6 y se necesitan estudios más exhaustivos en este sentido.

Poco se sabe acerca de los factores que aumentan o disminuyen la expresión de NLRP6 durante la lesión intestinal<sup>148</sup>. Se identificó el ácido orgánico taurina como un activador local del inflamasoma de NLRP6. La taurina es un componente del ácido biliar, que es modulado por bacterias comensales y que desempeña múltiples funciones en la regulación de los procesos inmunes y metabólicos. Por el contrario, los metabolitos histamina y espermina son inhibidores de la activación de NLRP6. La histamina y la poliamina espermina son metabolitos producidos tanto por la microbiota como por el huésped. Se describió como la deficiencia de *Nlrp6* crea un microentorno que favorece el crecimiento de bacterias comensales que son capaces de sintetizar poliamina, así como la expresión diferencial de las vías de producción y



degradación de histamina, lo que conduce a una acumulación intestinal de estos dos metabolitos<sup>153</sup>. Sin embargo, el concepto de activación es diferente del concepto de niveles de expresión. En este sentido, los niveles de ARNm de *NLRP6* en cultivos celulares células de hepatoma humano aumentan en respuesta a componentes de las bacterias gram negativas (LPS)<sup>155</sup>. También se ha visto en macrófagos derivados de la médula ósea, como el LTA, una molécula producida por las bacterias de gram positivas, se une y activa el inflamasoma no clásico de NLRP6<sup>156</sup>. La expresión de NLRP6 también está regulada de manera independiente de la microbiota. Así, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), liberada en condiciones experimentales de estrés, disminuye la expresión de NLRP6 y de los componentes del inflamasoma de NLRP6, conduce a una alteración de la permeabilidad intestinal<sup>157</sup>. También se ha observado mediante un análisis transcriptómico en rata que *Nlrp6* alberga sitios de unión para PPAR- $\gamma$ , un factor de transcripción miembro de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares que heterodimeriza con RXR- $\alpha$ <sup>154</sup>. El tratamiento *in vitro* de células de epiteliales intestinales humanas con el agonista de PPAR- $\gamma$ , rosiglitazona, aumentó los niveles de expresión de NLRP6<sup>154,274</sup>. Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta tesis, es que se desconocen los factores que producen la disminución en los niveles de expresión de NLRP6 durante el daño renal agudo experimental y humano. Este aspecto será objetivo de estudios posteriores en nuestro grupo de investigación.

El conjunto de resultados indica que NLRP6 se expresa de forma constitutiva en células tubulares renales. En este ambiente estéril, en el que no participa la microbiota, NLRP6 contribuye a atenuar las respuestas inflamatorias, al disminuir la activación de las vías de señalización de las MAPK ERK1/2 o p38. Durante el FRA, la expresión de NLRP6 se pierde y su deficiencia agrava la gravedad del FRA nefrotóxico. Se necesitan estudios más exhaustivos para abordar el potencial terapéutico de maniobras destinadas a preservar o aumentar la expresión de NLRP6 durante el FRA.

## 5.2. El papel antifibrótico de NLRP6 durante la ERC experimental

La ERC afecta a una de cada diez adultos en el mundo<sup>14</sup>. Según el estudio del “Global Burden Disease” de 2016, la mortalidad por ERC fue una de las que más creció entre 2006 y 2016, sólo por detrás del Alzheimer y se prevé que en 2100 sea la segunda causa de muerte más frecuente en España<sup>15,16</sup>. Además del impacto sobre la mortalidad, el 0,1% de la población española se encuentra en diálisis<sup>15</sup>, que sólo reemplaza entre el 5 y 10% de las funciones renales y supone un gasto muy elevado para el sistema sanitario<sup>17,18</sup>. Además, fuera de España, por cada persona que comienza diálisis, cuatro mueren por no tener acceso a este tratamiento.

La fibrosis es un proceso clave que caracteriza a la ERC. Durante la fibrosis los fibroblastos se activan y producen colágeno, fibronectina y proteoglicanos, que se depositan constituyendo una matriz extracelular que sustituye al tejido normal sano por un tejido de cicatrizal<sup>60,61</sup>. Previamente se ha descrito un papel protector de NLRP6 durante la fibrosis hepática<sup>264</sup>. NLRP6 suprime la expresión *in vitro* de colágenos de tipo I y tipo III, de  $\alpha$ -SMA y de metaloproteinasas de matriz (MMP2 y MMP9) en células hepáticas estrelladas humanas, mientras que la disminución en su expresión, produce efectos contrarios<sup>264</sup>.

En la base de datos Nephroseq de estudios transcriptómicos renales humanos, observamos una correlación positiva entre los niveles de ARNm de *NLRP6* en el riñón y la TFG<sub>e</sub>, la medida más usada de función renal. Esta observación era la opuesta de lo que ocurría con *NLRP3*, que es el miembro de la familia de los NLR que ha sido más estudiado y se sabe que es un impulsor de la fibrosis renal<sup>129,242,244–246</sup>. Estos resultados eran acordes con los resultados obtenidos en el FRA y sugerían un vínculo entre los niveles bajos de ARNm de *NLRP6* y la gravedad de la ERC.

El modelo de FRA experimental que habíamos estudiado se caracteriza por una fibrosis leve, por lo que no es un buen modelo para el estudio de la fibrosis. Por ello, abordamos el papel de NLRP6 en la fibrosis renal en el modelo del UUO, en el que tras la ligación irreversible de uno de los uréteres, se reproduce una hidronefrosis y fibrosis avanzada con inflamación intersticial, características ambas de la ERC humana<sup>231,256</sup>. Tras la obstrucción de la vía urinaria, observamos la pérdida de la expresión de NLRP6 de las células tubulares renales. Asimismo, la deficiencia de *Nlrp6* produjo una mayor gravedad de la fibrosis: los ratones deficientes para *Nlrp6* mostraban una mayor expresión de los genes profibróticos colágeno y fibronectina que los WT y la tinción con rojo sirio demostró una mayor intensidad de la fibrosis. La  $\alpha$ -SMA es una proteína que expresan los fibroblastos activados durante la fibrosis y hace que estos adquieran

un fenotipo contráctil, denominándose miofibroblastos<sup>62</sup>. Tras la obstrucción, los ratones deficientes para *Nlrp6* mostraban una mayor expresión de  $\alpha$ -SMA que los WT, sugiriendo un aumento del número de miofibroblastos, células clave en la fibrosis. De hecho, existe una relación entre un aumento en los niveles de  $\alpha$ -SMA con la disminución de la TFG en la ERC<sup>275</sup>. Es de destacar que cada riñón obstruido fue comparado con su riñón contralateral, no obstruido. En este sentido, observamos que los riñones contralaterales (no obstruidos) de los ratones deficientes para *Nlrp6*, tenían también una mayor expresión de  $\alpha$ -SMA que los riñones obstruidos de los WT, sugiriendo señales a distancia que impactan sobre la biología del riñón en teoría sano y que podrían corresponder a mayor liberación de factores profibróticos del riñón obstruido deficiente en *Nlrp6*.

La inflamación es un proceso clave en el inicio de la fibrosis. Células inflamatorias, como los macrófagos y otros leucocitos, liberan moléculas profibróticas o que estimulan la liberación de factores profibróticos por fibroblastos, células inmunes y células tubulares<sup>59</sup>. El infiltrado de macrófagos que caracteriza a la ERC experimental es mayor en ausencia de *Nlrp6*. Este mayor infiltrado podría ser causado por una mayor expresión de ARNm de las quimiocinas *Mcp-1* y *Rantes* tras la obstrucción ureteral en los ratones *Nlrp6*KO que en los WT, una observación concordante con los resultados obtenidos en el FRA.

Todo esto indica que NLRP6 podría tener un papel en las etapas iniciales de la ERC, atenuando la respuesta inflamatoria inicial y previniendo la progresión del daño renal a una fibrosis exacerbada, característica de etapas avanzadas de esta enfermedad.

D

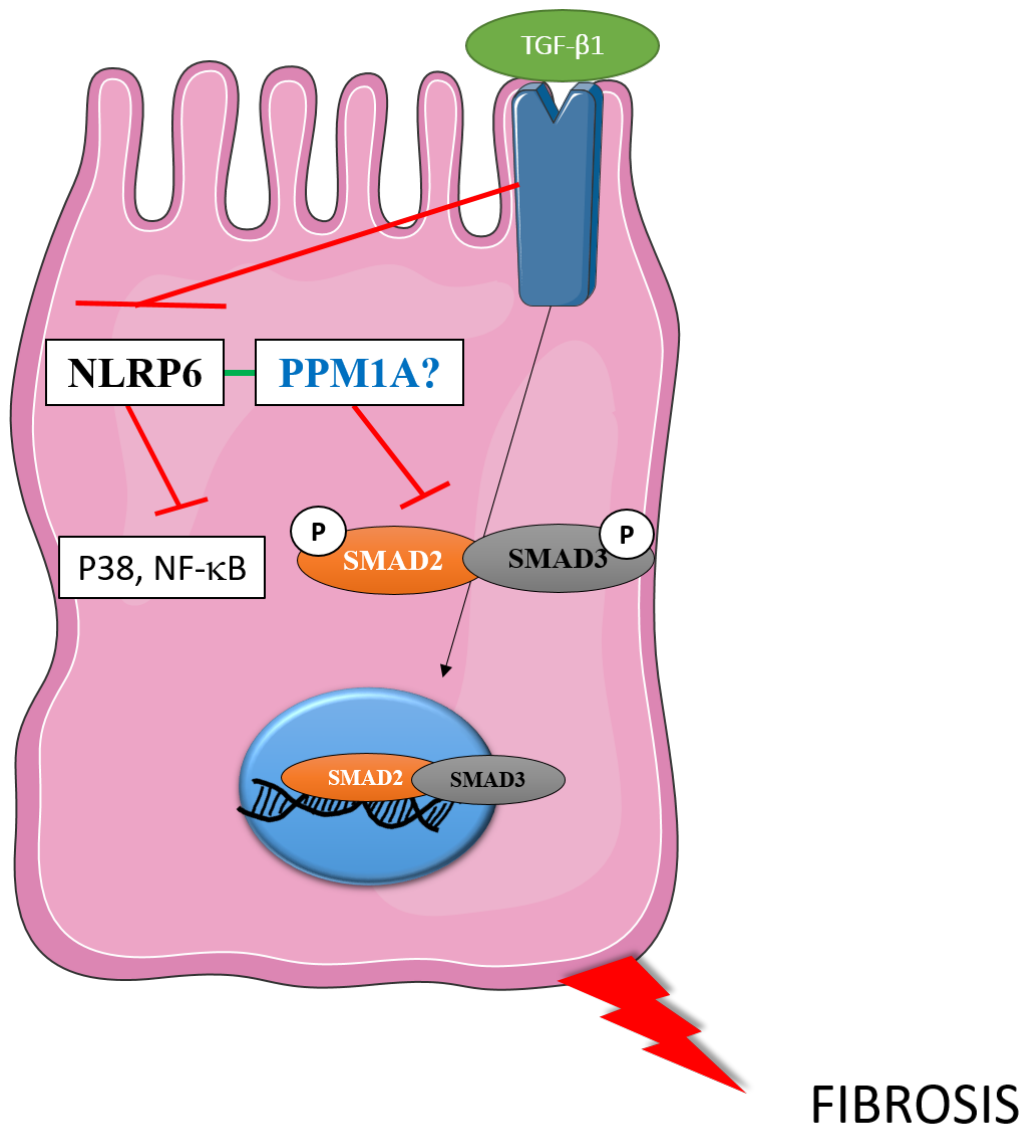
TGF- $\beta$ 1 es el principal mediador de la fibrosis renal. TGF- $\beta$ 1 activa p38<sup>261</sup> y promueve la expresión de factores profibróticos, como la  $\alpha$ -SMA, colágeno I y fibronectina, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>276</sup>. De hecho, el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 previene la fibrosis y pérdida de función renal<sup>59,277</sup>. En este sentido, la activación de p38 contribuye a la progresión de la fibrosis renal<sup>261</sup>. En nuestros estudios observamos como la deficiencia de *Nlrp6* produce un aumento de la activación de p38 y de la expresión de estos factores profibróticos. La adición de TGF- $\beta$ 1 a células tubulares murinas en cultivo produjo una disminución de la expresión de *Nlrp6*. Esto plantea la hipótesis de que uno de los mediadores del efecto lesivo de TGF- $\beta$ 1 pueda ser la inducción de una deficiencia de *Nlrp6*. Esta hipótesis deberá abordarse con estudios de intervención *in vivo*.

En el modelo del FRA experimental, se observó que la deficiencia de *Nlrp6* producía una activación de la vía de las MAPK, tanto de ERK1/2, como de p38 incluso de forma basal en los ratones inyectados con el vehículo. Tras el UUO, no se observaron diferencias basales en la activación de ERK1/2 y p38 entre los ratones *Nlrp6*KO y los WT. Esto podría deberse a que los riñones contralaterales, utilizados como control,

sufren cambios metabólicos, celulares y sobre todo, compensatorios de la función renal<sup>260</sup> tras la obstrucción urinaria unilateral, por lo que la vía de las MAPK podría tener un papel en este proceso adaptativo. Tras la obstrucción, observamos una mayor activación de ERK1/2 y p38 en ratones WT, que fue todavía más llamativa para p38 en los ratones deficientes para *Nlrp6*, que en ratones WT. Sin embargo, no se objetivaron diferencias significativas en la fosforilación de ERK1/2 entre los ratones *Nlrp6*KO y los WT tras el UUO. Al igual que en el modelo del FRA, tras la obstrucción, se observó un aumento de la producción de quimiocinas proinflamatorias, que se agravaba con la deficiencia de *Nlrp6*. Estos resultados sugieren que la deficiencia de *Nlrp6*, produce una desregulación de la inflamación y en concreto, de la activación de p38, lo que favorecería a la progresión de la fibrosis.

Previamente se había descrito el papel del inflamasoma, especialmente de NLRP3, durante la ERC. Se ha descrito un papel profibrótico de IL-18 en células tubulares murinas, a través de la vía de STAT-3<sup>120</sup> y TLR4<sup>121</sup>. El inflamasoma también podría contribuir a la ERC humana, dónde se han descrito niveles elevados de IL-18 en el epitelio tubular<sup>278</sup>. En este sentido, NLRP3, que al contrario que NLRP6 tiene acciones profibróticas, produjo un aumento de los niveles de TGF- $\beta$ 1, de forma independiente del inflamasoma. Durante el ERC experimental, al igual que en el FRA, los niveles plasmáticos de IL-18 fueron menores en los ratones *Nlrp6*KO que en los WT.

Los factores de transcripción SMAD2 y de SMAD3 son responsables de los cambios de expresión génica en respuesta a TGF- $\beta$ 1<sup>279</sup>. Durante la fibrosis hepática, en la que se ha descrito un papel antifibrótico de NLRP6, la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 estaba reducida, como consecuencia de la sobreexpresión de NLRP6. La fosfatasa PPM1A, es la única fosfatasa descrita para SMAD2 y SMAD3, y tiene efectos antifibrogénicos, *in vivo*<sup>280</sup>. Durante la fibrosis hepática, la interacción de NLRP6 y PPM1A es necesaria para los efectos protectores de NLRP6<sup>264</sup>. La proteína PPM1A se encuentra altamente expresada en células tubulares renales<sup>281</sup> y es un regulador negativo de p38<sup>282</sup> y de NF- $\kappa$ B<sup>283</sup>. Durante el ERC experimental, la deficiencia de *Nlrp6* produce un aumento en los niveles de proteína de p38 y de ARNm de las quimiocinas proinflamatorias *Rantes* y *Mcp-1*, que son dianas canónicas de NF- $\kappa$ B. PPM1A podría ser un vínculo entre NLRP6 y su papel protector durante la fibrosis renal. Una hipótesis sería que las acciones antifibróticas de NLRP6 en células tubulares renales podrían depender de la formación de un complejo con PPM1A, que desfosforilaría las proteínas SMAD2 y SMAD3, inhibiendo la vía de TGF- $\beta$ 1, con la consecuente regulación negativa de p38 y de NF- $\kappa$ B (Figura 34).



**Figura 34: Mecanismo hipotético del efecto antifibrótico de NLRP6 tendría durante la ERC.** Posible interacción entre NLRP6 y PPM1A que inhibiría la señalización de TGF-β1, regulando negativamente p38 y NF-κB. TGF-β1 además reduce la expresión de Nlrp6.

En resumen, hemos observado una disminución de la expresión renal de NLRP6 en la ERC experimental y humana, al igual que ocurría en el FRA. La deficiencia de *Nlrp6* agrava la inflamación renal, como en el FRA y además, también agrava la fibrosis renal durante la ERC experimental. Sin embargo, una limitación de este estudio, es que no se han identificado todavía los factores que impulsan la regulación negativa de la expresión de NLRP6 durante la fibrosis renal. Además, aunque los resultados son compatibles con un papel clave de la regulación de la activación de la vía de TGF-β1 y con un posible papel de ciertas fosfatasa en este proceso, se necesitan estudios adicionales para caracterizar bien los mecanismos moleculares implicados y para abordar el posible papel de un aumento de la expresión o actividad de NLRP6 como una estrategia terapéutica, para tratar de frenar la fibrosis y con ello, la progresión a ERC.

### 5.3. Expresión de NLRP6 en el intestino tras el daño renal

NLRP6 está altamente expresado en tracto gastrointestinal y existe una estrecha relación entre daño renal y fisiopatología intestinal<sup>284,285</sup>. Hemos observado que la expresión de NLRP6 en el colon sano se localiza sobre todo en las criptas de Lieberkühn, en las que se encuentran células caliciformes y enterocitos. Las células caliciformes de estas criptas producen mucus, que constituye otra barrera intestinal. Durante el FRA experimental, tanto por ácido fólico como por cisplatino, hemos observado una disminución de la expresión de NLRP6 en el colon, como consecuencia de la inducción del daño renal agudo. Además, en muestras de colon humanas de pacientes con enfermedad renal, también observamos que NLRP6 está disminuido.

En los últimos años la microbiota ha sido foco de estudio. Existen diferentes trabajos experimentales que sugieren una relación entre el intestino y el riñón, donde la microbiota intestinal parece comunicarse con las células renales, por un mecanismo todavía desconocido, afectando a la función y daño renal y al daño de otros órganos<sup>286</sup>. Alteraciones en la microbiota afectan a la progresión de la enfermedad renal de aguda a crónica y la enfermedad renal, a su vez, parece producir disbiosis<sup>287</sup>. Además, desórdenes gastrointestinales asociados a la disbiosis tienen un papel en el desarrollo de la nefropatía diabética<sup>288</sup> y en la nefropatía por inmunoglobulina A (NlgA)<sup>289</sup>.

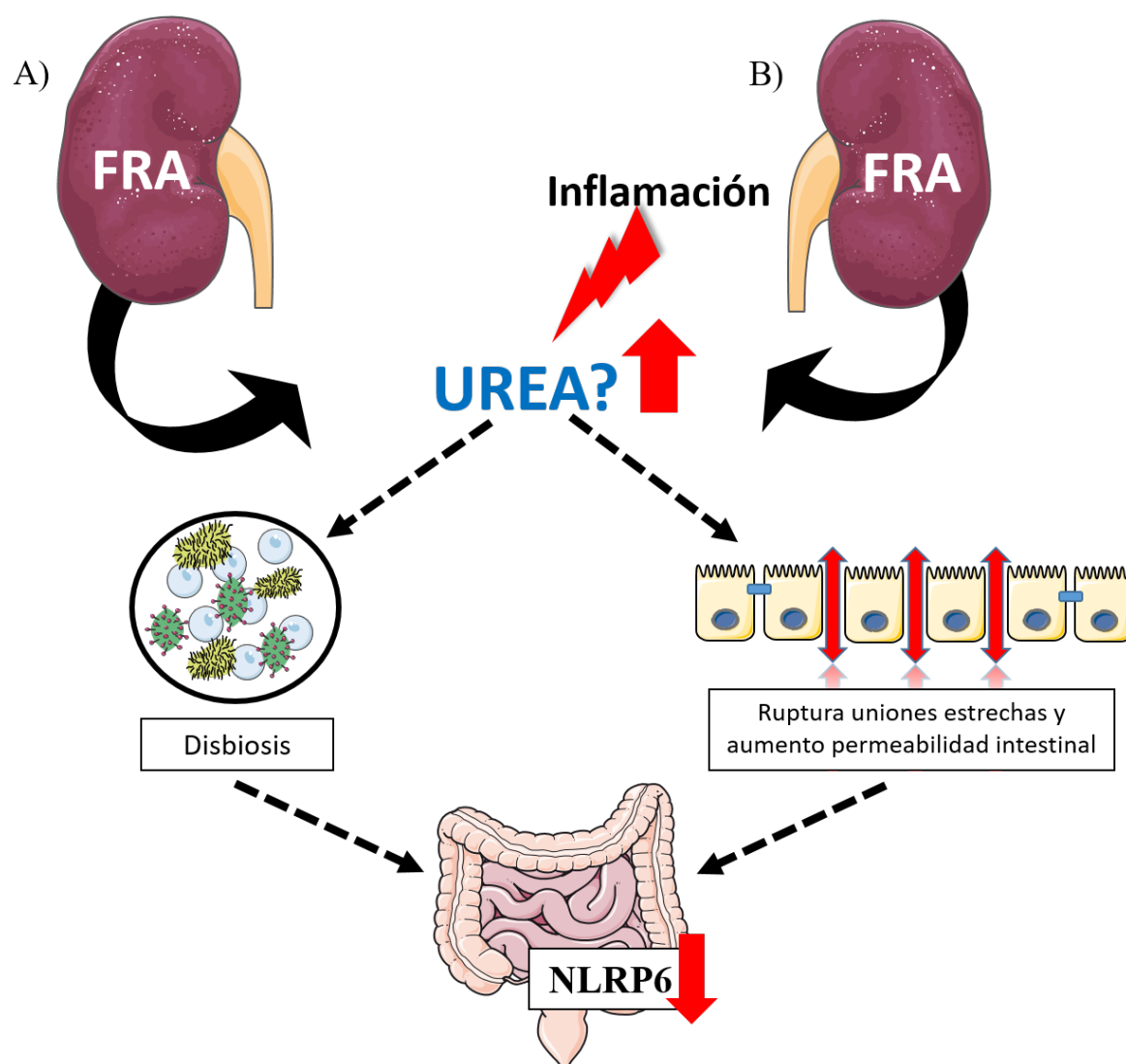
Durante la enfermedad renal se produce una alteración de la concentración de muchas moléculas de la sangre que normalmente serían excretadas por el riñón, como por ejemplo la urea, pero que debido al daño pueden ser acumuladas. Las toxinas urémicas acumuladas durante la enfermedad renal, pueden proceder del metabolismo de la microbiota y favorecen tanto la progresión del daño renal, como la afectación de otros órganos en la ERC<sup>290</sup>. Así, los pacientes en diálisis con el colon intacto presentan niveles más elevados de toxinas urémicas, como el indoxil sulfato, en comparación con los que no tienen colon, indicando la posible contribución de la microbiota intestinal en la producción de toxinas urémicas<sup>291</sup>. Además, la microbiota puede producir cambios en el perfil inflamatorio, regulando la producción de quimiocinas por células inmunes<sup>292</sup>. También se ha descrito un posible papel de la microbiota en la hipertensión arterial, que es un inductor conocido de enfermedad renal. En esto parece tener un papel clave los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), sobre todo acetato y propionato, que son producidos como consecuencia de productos finales de la fermentación de fibras dietéticas por la microbiota. Los AGCC también inducen respuestas inmunes regulando la función de las células inmunes y su diferenciación celular<sup>286</sup>.

Además, la enfermedad renal puede a su vez producir disbiosis<sup>286</sup> y un posible mecanismo por el que durante la enfermedad renal puede producir disbiosis es a través de la secreción al intestino de urea y de otras toxinas urémicas<sup>293</sup>. La urea se produce en el hígado como consecuencia de la degradación de compuestos nitrogenados procedentes de las proteínas. La microbiota hidroliza la urea, formando amonio, lo que afecta al crecimiento bacteriano y favorece la disbiosis<sup>294</sup>.

La importancia de la microbiota y de su interacción con el organismo queda ilustrada por el interés creciente en el trasplante de microbiota fecal procedente de donantes sanos con el fin de manipular las características de la microbiota del receptor. Esto permite frenar la disbiosis, indicación para la que se usa en clínica en el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*. Además, se está estudiando su impacto sobre un gran número afecciones, no solo las intestinales, sino en enfermedad de Parkinson, fibromialgia, síndrome de fatiga crónica, distopía mioclónica, esclerosis múltiple, obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y autismo<sup>295</sup>.

La disminución de la expresión de NLRP6 en el colon durante el daño renal, podría deberse a la disbiosis asociada a la uremia. Una microbiota anormal puede, por si misma, disminuir los niveles de expresión de NLRP6 a través de metabolitos específicos producidos por la microbiota como la histamina y la espermina<sup>153</sup>. Por lo tanto, una posibilidad es que la disbiosis producida por la lesión renal reduzca la expresión de NLRP6 en el intestino (**Figura 35 A**).

Además, hay evidencia de que diversas toxinas urémicas contribuyen a la pérdida de uniones estrechas y de la integridad de la barrera epitelial intestinal, lo que contribuye a la inflamación sistémica característica de la enfermedad renal<sup>296,297</sup>. Como consecuencia de esta pérdida de integridad, aumenta la permeabilidad a sustancias tóxicas y organismos patógenos del lumen intestinal<sup>298–300</sup>. Además, en pacientes en hemodiálisis se ha descrito una inflamación del tracto gastrointestinal<sup>301</sup>.



**Figura 35: Mecanismo hipotéticos por los que el FRA o la ERC producirían una disminución de la expresión de NLRP6 en el colon.** El aumento de toxinas urémicas como la urea podría **A)** producir disbiosis, que a su vez disminuiría los niveles de NLRP6 en el colon o **B)** produciría una lesión epitelial intestinal, similar a la que causa ruptura de uniones estrechas, disminuyendo los niveles de NLRP6.

La ruptura de la barrera intestinal debido a la pérdida de las uniones estrechas aumenta la permeabilidad de sustancias no deseadas y libera productos de deshecho al interior del lumen intestinal<sup>302,303</sup>. Esto contribuye a la activación de células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, generando una respuesta inflamatoria que, a su vez, aumenta el daño de las uniones estrechas, creando un bucle autoperpetuante<sup>304–307</sup>. Así, otra hipótesis que explicaría la disminución de la expresión de NLRP6 en el colon tras el FRA, podría ser que la inflamación sistémica o el acúmulo de toxinas urémicas dañaría el epitelio intestinal directamente o tras la ruptura de las uniones estrechas epiteliales, que, al aumentar la permeabilidad, provocaría la lesión intestinal, con la consecuente disminución de la expresión de NLRP6 (**Figura 35 B**).



En resumen, el daño renal disminuye los niveles de NLRP6 en las criptas del colon, que constituyen una barrera de defensa intestinal. El mecanismo todavía no ha sido descrito. Sin embargo, nuestros resultados evidencian la existencia de un eje entre el riñón y el tracto gastrointestinal en el que NLRP6 parece tener un papel clave en su regulación. Se requieren estudios que evalúen el posible papel de la “uremia”, entendida como el acúmulo de diversas toxinas urémicas, en este proceso y si requiere o no la participación de la microbiota. NLRP6 resulta una posible diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad renal y afecciones gastrointestinales y que permitiría entender la asociación entre ambas.

# Conclusiones



*"Y al final, siento menos curiosidad por la gente y más curiosidad por las ideas"*

**MARIE CURIE**

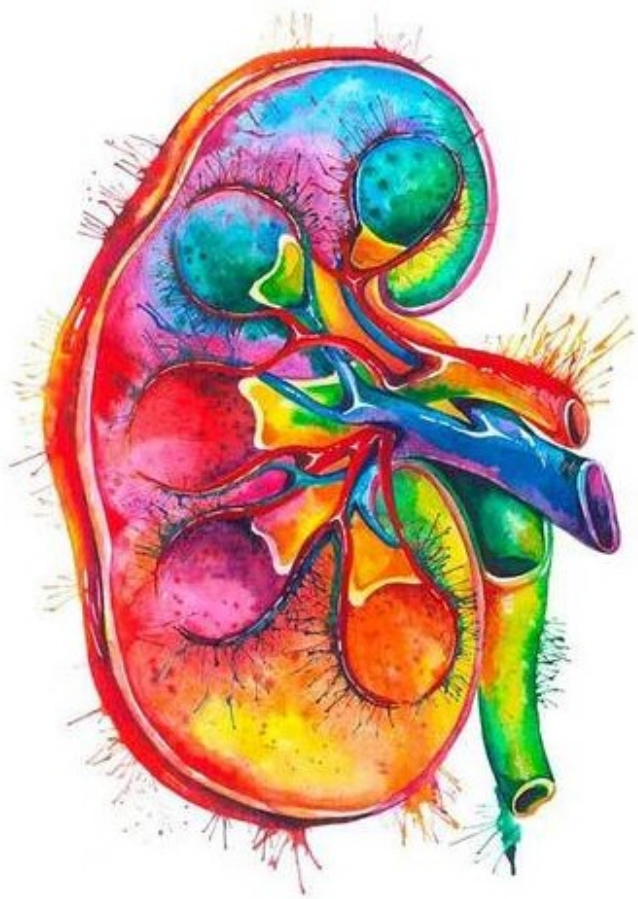
## 6. CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se ha evaluado el papel NLRP6 durante la patogenia del fracaso renal agudo, así como las respuestas involucradas en el proceso inflamatorio y su papel en la progresión hacia la fibrosis y la enfermedad renal crónica. Además, también se ha investigado la conexión entre daño renal y expresión de NLRP6 en las células intestinales.

En conclusión, se ha demostrado que:

- 1) *Nlrp6* es el miembro de la familia de los NLR que más se expresa en el riñón murino en condiciones basales.
- 2) Su expresión renal e intestinal disminuye durante la enfermedad renal, sugiriendo un papel durante el daño renal y en el eje riñón-intestino.
- 3) La deficiencia de *Nlrp6* agrava el fracaso renal agudo y la enfermedad renal crónica experimental.
- 4) El papel nefroprotector de NLRP6 tiene lugar en un ambiente estéril y parece mediado por una amortiguación de las respuestas inflamatorias y fibróticas, probablemente al prevenir la activación de la vía de las MAPK.
- 5) Se deberían explorar intervenciones terapéuticas destinadas a conservar o aumentar la expresión de NLRP6 durante el daño renal.

# Bibliografía



*“Si sólo lees lo que todo el mundo está leyendo, sólo puedes pensar lo que todos los demás están pensando”*

*HARUKI MURAKAMI*

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Rosivall, L. & Mirzahosseini, S. *RENAL GENERAL FUNCTIONS*.
2. Gilbert, S. J. *et al. National Kidney Foundation's primer on kidney diseases*.
3. Chawla, L. S. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* **82**, 516–524 (2012).
4. Bellomo, R., Kellum, J. A. & Ronco, C. Acute kidney injury. *Lancet (London, England)* **380**, 756–66 (2012).
5. Acute Kidney Injury (AKI) | KDIGO. Available at: <https://kdigo.org/guidelines/acute-kidney-injury/>. (Accessed: 3rd January 2019)
6. Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S. & Anders, H.-J. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 759–67 (2014).
7. Martin-Sanchez, D. *et al.* TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 4182–4187 (2018).
8. Ortiz, A. Translational nephrology: what translational research is and a bird's-eye view on translational research in nephrology. *Clin. Kidney J.* **8**, 14–22 (2015).
9. Ortega, A. *et al.* Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1594–603 (2006).
10. Ortiz, A. *et al.* Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int.* **57**, 969–981 (2000).
11. Doi, K. *et al.* Attenuation of Folic Acid-Induced Renal Inflammatory Injury in Platelet-Activating Factor Receptor-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* **168**, 1413–1424 (2006).
12. Ramesh, G. & Reeves, W. B. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J. Clin. Invest.* **110**, 835–42 (2002).
13. CKD Evaluation and Management | KDIGO. Available at: <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/>. (Accessed: 3rd January 2019)
14. Eckardt, K.-U. *et al.* Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet (London, England)* **382**, 158–69 (2013).
15. Ortiz, A. *et al.* The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. *Nefrologia* (2018). doi:10.1016/j.nefro.2018.09.002
16. Soriano, J. B. *et al.* La carga de enfermedad en España: resultados del Estudio de la Carga Global de las Enfermedades 2016. *Med. Clin. (Barc)*. **151**, 171–190 (2018).
17. Vanholder, R. *et al.* Clinical management of the uraemic syndrome in chronic kidney disease. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **4**, 360–373 (2016).
18. Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Ramos, A. M., Ruiz-Ortega, M. & Ortiz, A. Translational science in chronic kidney disease. *Clin. Sci.* **131**, 1617–1629 (2017).

19. Pfeffer, M. A. *et al.* A Trial of Darbepoetin Alfa in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2019–2032 (2009).
20. Siwy, J. *et al.* Noninvasive diagnosis of chronic kidney diseases using urinary proteome analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **32**, gfw337 (2016).
21. Cijiang He, J., Chuang, P. Y., Ma'Ayan, A. & Iyengar, R. Systems biology of kidney diseases. *Kidney Int.* **81**, 22–39 (2012).
22. Schanstra, J. P. & Mischak, H. Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation. *Pediatr. Nephrol.* **30**, 713–725 (2015).
23. Decramer, S. *et al.* Urine in Clinical Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1850–1862 (2008).
24. Caubet, C. *et al.* Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 27–35 (2010).
25. Izquierdo, M. C. *et al.* Acute kidney injury transcriptomics unveils a relationship between inflammation and ageing. *Nefrologia* **32**, 715–23 (2012).
26. Izquierdo, M. C. *et al.* TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int.* **81**, 1098–107 (2012).
27. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 610–21 (2010).
28. Sanchez-Nino, M. D. *et al.* The MIF Receptor CD74 in Diabetic Podocyte Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 353–362 (2009).
29. Lorz, C. *et al.* The Death Ligand TRAIL in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 904–914 (2008).
30. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. *Lab. Invest.* **92**, 32–45 (2012).
31. Ortiz, A. *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinase 14 Promotes AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 823–836 (2017).
32. Valiño-Rivas, L. *et al.* MAGE genes in the kidney: identification of *MAGED2* as upregulated during kidney injury and in stressed tubular cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2018). doi:10.1093/ndt/gfy367
33. Solez, K., Morel-Maroger, L. & Sraer, J. D. The morphology of “acute tubular necrosis” in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine (Baltimore)*. **58**, 362–76 (1979).
34. Olsen, T. S., Olsen, H. S. & Hansen, H. E. Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* **406**, 75–89 (1985).
35. Basile, D. P., Anderson, M. D. & Sutton, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr. Physiol.* **2**, 1303–53 (2012).
36. Martin-Sanchez, D. *et al.* Targeting of regulated necrosis in kidney disease. *Nefrologia* **38**, 125–135 (2018).
37. Sanz, A. B., Santamaría, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. & Ortiz, A. Mechanisms of renal

- apoptosis in health and disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1634–42 (2008).
38. Thorburn, A. Death receptor-induced cell killing. *Cell. Signal.* **16**, 139–44 (2004).
  39. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 255–60 (1999).
  40. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–8 (1998).
  41. Castillo-Rodriguez, E. *et al.* Kidney Injury Marker 1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Chronic Kidney Disease. *Nephron* **136**, 263–267 (2017).
  42. Yang, L. *et al.* KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J. Clin. Invest.* **125**, 1620–36 (2015).
  43. Linkermann, A. *et al.* Regulated Cell Death in AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 2689–2701 (2014).
  44. Mulay, S. R., Linkermann, A. & Anders, H.-J. Necroinflammation in Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 27–39 (2016).
  45. Linkermann, A. Nonapoptotic cell death in acute kidney injury and transplantation. *Kidney Int.* **89**, 46–57 (2016).
  46. Sanz, A. B. *et al.* Macrophages and recently identified forms of cell death. *Int. Rev. Immunol.* **33**, 9–22 (2014).
  47. Wallach, D., Kang, T.-B., Dillon, C. P. & Green, D. R. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science* **352**, aaf2154 (2016).
  48. Havasi, A. & Borkan, S. C. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int.* **80**, 29–40 (2011).
  49. Justo, P. *et al.* Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int.* **70**, 1750–8 (2006).
  50. Linkermann, A. *et al.* Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12024–9 (2013).
  51. Akcay, A., Nguyen, Q. & Edelstein, C. L. Mediators of Inflammation in Acute Kidney Injury. *Mediators Inflamm.* **2009**, 1–12 (2009).
  52. Sanz, A. B. *et al.* NF- $\kappa$ B in Renal Inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1254–1262 (2010).
  53. Sanz, A. B. *et al.* NF-kappaB in renal inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1254–62 (2010).
  54. Jang, H. R. & Rabb, H. Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 88–101 (2015).
  55. de Haij, S., Daha, M. R. & van Kooten, C. Mechanism of steroid action in renal epithelial cells. *Kidney Int.* **65**, 1577–88 (2004).
  56. Thurman, J. M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin. Immunol.* **123**, 7–13 (2007).
  57. Sanz, A. B. *et al.* The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J.*

- Am. Soc. Nephrol.* **19**, 695–703 (2008).
58. Moreno, J. A. *et al.* The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF Reduce Renal Klotho Expression through NF B. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1315–1325 (2011).
  59. Lv, W., Booz, G. W., Wang, Y., Fan, F. & Roman, R. J. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur. J. Pharmacol.* **820**, 65–76 (2018).
  60. Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 493–503 (2014).
  61. Strutz, F. & Zeisberg, M. Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2992–2998 (2006).
  62. Campanholle, G., Ligresti, G., Gharib, S. A. & Duffield, J. S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**, C591–603 (2013).
  63. Sureshbabu, A., Muhsin, S. A. & Choi, M. E. TGF- $\beta$  signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *Am. J. Physiol. Physiol.* **310**, F596–F606 (2016).
  64. Sakhon, O. S. *et al.* NSD1 mitigates caspase-1 activation by listeriolysin O in macrophages. *PLoS One* **8**, e75911 (2013).
  65. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417–26 (2002).
  66. Agostini, L. *et al.* NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319–25 (2004).
  67. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666–71 (2015).
  68. Awad, F. *et al.* Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **187**, 133–149 (2018).
  69. Kim, Y. K., Shin, J.-S. & Nahm, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med. J.* **57**, 5 (2016).
  70. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337 (2009).
  71. Kolli, D., Velayutham, T. S. & Casola, A. Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections. *Pathogens* **2**, 232 (2013).
  72. Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y.-G. & Nuñez, G. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **4**, 365–398 (2009).
  73. Motta, V., Soares, F., Sun, T. & Philpott, D. J. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiol. Rev.* **95**, 149–178 (2015).
  74. Ting, J. P.-Y. *et al.* The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity* **28**, 285 (2008).
  75. Kortmann, J., Brubaker, S. W. & Monack, D. M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *J. Immunol.* **195**, 815–819



- (2015).
76. Man, S. M. & Kanneganti, T.-D. Regulation of inflammasome activation. doi:10.1111/imr.12296
  77. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–22 (2014).
  78. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–420 (2016).
  79. Levandowski, C. B. *et al.* NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 $\beta$  processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2952–6 (2013).
  80. Grandemange, S. *et al.* NLRP1 mutations cause autoinflammatory diseases in human. *Pediatr. Rheumatol.* **13**, O22 (2015).
  81. Witola, W. H. *et al.* NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect. Immun.* **79**, 756–66 (2011).
  82. Liu, F. *et al.* Expression of NALP1 in cerebellar granule neurons stimulates apoptosis. *Cell. Signal.* **16**, 1013–21 (2004).
  83. He, Y., Hara, H. & Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 1012–1021 (2016).
  84. Jha, S., Brickey, W. J. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes in Myeloid Cells: Warriors Within. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
  85. Chen, J., Wang, Z. & Yu, S. AIM2 regulates viability and apoptosis in human colorectal cancer cells via the PI3K/Akt pathway. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 811–817 (2017).
  86. Ponomareva, L. *et al.* AIM2, an IFN-inducible cytosolic DNA sensor, in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Mol. Cancer Res.* **11**, 1193–202 (2013).
  87. Haneklaus, M., O'Neill, L. A. J. & Coll, R. C. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 40–5 (2013).
  88. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 397–411 (2013).
  89. Mo, J. *et al.* Pathogen Sensing by Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2 (NOD2) Is Mediated by Direct Binding to Muramyl Dipeptide and ATP. *J. Biol. Chem.* **287**, 23057–23067 (2012).
  90. Suárez, R. & Buelvas, N. *El inflammasoma: mecanismos de activación. Investigación Clínica* **56**, (2015).
  91. Lightfield, K. L. *et al.* Differential Requirements for NAIP5 in Activation of the NLRC4 Inflammasome. *Infect. Immun.* **79**, 1606–1614 (2011).
  92. Kofoed, E. M. & Vance, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**, 592–595 (2011).
  93. Bauernfeind, F. G. *et al.* Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and

- Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791 (2009).
94. Franchi, L., Eigenbrod, T. & Nunez, G. Cutting Edge: TNF- $\alpha$  Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J. Immunol.* **183**, 792–796 (2009).
  95. Gurung, P. *et al.* FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *J. Immunol.* **192**, 1835–1846 (2014).
  96. Allam, R. *et al.* Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO Rep.* **15**, 982–990 (2014).
  97. Py, B. F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H. & Yuan, J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Mol. Cell* **49**, 331–338 (2013).
  98. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
  99. Lee, G.-S. *et al.* The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature* **492**, 123–127 (2012).
  100. Chu, J. *et al.* Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 $\beta$  from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1227–1238 (2009).
  101. Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121 (2011).
  102. He, W. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell Res.* **25**, 1285–1298 (2015).
  103. Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Liu, Q. & Núñez, G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity* **43**, 923–932 (2015).
  104. Gaidt, M. M. *et al.* Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* **44**, 833–846 (2016).
  105. Gabay, C., Lamacchia, C. & Palmer, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 232–41 (2010).
  106. Chung, Y. *et al.* Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* **30**, 576–587 (2009).
  107. Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S. R. & Tipping, P. G. Leukocyte-derived interleukin-1 $\beta$  interacts with renal interleukin-1 receptor I to promote renal tumor necrosis factor and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* **164**, 1967–77 (2004).
  108. Bonnemaïson, M. L., Marks, E. S. & Boesen, E. I. Interleukin-1 $\beta$  as a driver of renal NGAL production. *Cytokine* **91**, 38–43 (2017).
  109. Konno, T. *et al.* Expression and Function of Interleukin-1 $\beta$ -Induced Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Renal Tubular Cells. *PLoS One* **11**, e0166707 (2016).
  110. Nee, L., Tuite, N., Ryan, M. P. & McMorrow, T. TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$ -mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in human glomerular mesangial cells. *Nephron. Exp.*

- Nephrol.* **107**, e73-86 (2007).
111. Zhong, S. *et al.* Inflammatory Stress Exacerbated Mesangial Foam Cell Formation and Renal Injury via Disrupting Cellular Cholesterol Homeostasis. *Inflammation* **38**, 959–71 (2015).
  112. Takano, Y. *et al.* Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: Roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS Lett.* **581**, 421–426 (2007).
  113. DU, L. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  increases permeability and upregulates the expression of vascular endothelial-cadherin in human renal glomerular endothelial cells. *Mol. Med. Rep.* **11**, 3708–3714 (2015).
  114. Bombardieri, M., McInnes, I. B. & Pitzalis, C. Interleukin-18 as a potential therapeutic target in chronic autoimmune/inflammatory conditions. *Expert Opin. Biol. Ther.* **7**, 31–40 (2007).
  115. Yamamura, M. *et al.* Interferon- $\gamma$ -inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **44**, 275–285 (2001).
  116. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650 (2013).
  117. Schrijvers, B. F., De Vriese, A. S. & Flyvbjerg, A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr. Rev.* **25**, 971–1010 (2004).
  118. Kitching, A. R. *et al.* IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2023–33 (2005).
  119. Bani-Hani, A. H. *et al.* IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial–mesenchymal transition and renal fibrosis. *Kidney Int.* **76**, 500–511 (2009).
  120. Matsui, F., Rhee, A., Hile, K. L., Zhang, H. & Meldrum, K. K. IL-18 induces profibrotic renal tubular cell injury via STAT3 activation. *Am. J. Physiol. Physiol.* **305**, F1014–F1021 (2013).
  121. Meldrum, K. K. *et al.* Profibrotic Effect of Interleukin-18 in HK-2 Cells Is Dependent on Stimulation of the Toll-like Receptor 4 (TLR4) Promoter and Increased TLR4 Expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 40391–40399 (2012).
  122. Zhang, H. *et al.* IL-18 mediates proapoptotic signaling in renal tubular cells through a Fas ligand-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Physiol.* **301**, F171–F178 (2011).
  123. Iyer, S. S. *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20388–93 (2009).
  124. Cao, Y. *et al.* Role of the nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome in acute kidney injury. *FEBS J.* **282**, 3799–3807 (2015).
  125. Komada, T. *et al.* Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Sci. Rep.* **5**, 10901 (2015).
  126. Shen, J. *et al.* NLRP3 inflammasome mediates contrast media-induced acute kidney injury by regulating cell apoptosis. *Sci. Rep.* **6**, 34682 (2016).
  127. Mulay, S. R. *et al.* Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-

- mediated IL-1 $\beta$  secretion. *J. Clin. Invest.* **123**, 236–246 (2013).
128. Babelova, A. *et al.* Biglycan, a Danger Signal That Activates the NLRP3 Inflammasome via Toll-like and P2X Receptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 24035–24048 (2009).
  129. Vilaysane, A. *et al.* The NLRP3 Inflammasome Promotes Renal Inflammation and Contributes to CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1732–1744 (2010).
  130. Komada, T. *et al.* ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. *Am. J. Pathol.* **184**, 1287–98 (2014).
  131. Guo, H., Bi, X., Zhou, P., Zhu, S. & Ding, W. NLRP3 Deficiency Attenuates Renal Fibrosis and Ameliorates Mitochondrial Dysfunction in a Mouse Unilateral Ureteral Obstruction Model of Chronic Kidney Disease. *Mediators Inflamm.* **2017**, 1–10 (2017).
  132. Chi, H.-H. *et al.* IL-36 Signaling Facilitates Activation of the NLRP3 Inflammasome and IL-23/IL-17 Axis in Renal Inflammation and Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 2022–2037 (2017).
  133. Brissette, M.-J., Laplante, P., Qi, S., Latour, M. & Cailhier, J.-F. Milk fat globule epidermal growth factor-8 limits tissue damage through inflammasome modulation during renal injury. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 1135–1146 (2016).
  134. Granata, S. *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation in Dialyzed Chronic Kidney Disease Patients. *PLoS One* **10**, e0122272 (2015).
  135. Molitch, M. E. *et al.* Diabetic kidney disease: a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* **87**, 20–30 (2015).
  136. Chen, K. *et al.* ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 932–43 (2013).
  137. Shahzad, K. *et al.* Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **87**, 74–84 (2015).
  138. Mirza, R. E., Fang, M. M., Weinheimer-Haus, E. M., Ennis, W. J. & Koh, T. J. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes* **63**, 1103–14 (2014).
  139. Holdsworth, S. R., Gan, P.-Y. & Kitching, A. R. Biologics for the treatment of autoimmune renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 217–231 (2016).
  140. Andersen, K., Eltrich, N., Lichtnekert, J., Anders, H.-J. & Vielhauer, V. The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms. *Kidney Int.* **86**, 965–978 (2014).
  141. Zhao, J. *et al.* Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B activation. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 116–122 (2013).
  142. Tsai, Y.-L. *et al.* NLRP3 inflammasome: Pathogenic role and potential therapeutic target for IgA nephropathy. *Sci. Rep.* **7**, 41123 (2017).
  143. Liu, G. *et al.* Astaxanthin attenuates adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis. *Pharmacology* **95**, 193–200 (2015).
  144. Pontillo, A. *et al.* Polimorphisms in Inflammasome Genes Are Involved in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity* **45**, 271–278 (2012).
  145. Zhang, W. *et al.* AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lupus

- erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation. *J. Clin. Immunol.* **33**, 925–37 (2013).
146. Yuan, F. *et al.* Involvement of the NLRC4-Inflammasome in Diabetic Nephropathy. *PLoS One* **11**, e0164135 (2016).
  147. Chen, G. Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J. & Núñez, G. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J. Immunol.* **186**, 7187–94 (2011).
  148. Levy, M., Shapiro, H., Thaïss, C. A. & Elinav, E. NLRP6: A Multifaceted Innate Immune Sensor. *Trends Immunol.* **38**, 248–260 (2017).
  149. Elinav, E. *et al.* NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell* **145**, 745–757 (2011).
  150. Normand, S. *et al.* Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9601–6 (2011).
  151. Gremel, G. *et al.* The human gastrointestinal tract-specific transcriptome and proteome as defined by RNA sequencing and antibody-based profiling. *J. Gastroenterol.* **50**, 46–57 (2015).
  152. Włodarska, M. *et al.* NLRP6 Inflammasome Orchestrates the Colonic Host-Microbial Interface by Regulating Goblet Cell Mucus Secretion. *Cell* **156**, 1045–1059 (2014).
  153. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **163**, 1428–1443 (2015).
  154. Kempster, S. L. *et al.* Developmental control of the Nlrp6 inflammasome and a substrate, IL-18, in mammalian intestine. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **300**, G253–G263 (2011).
  155. Lee, H. J. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  agonist ameliorated inflammasome activation in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **21**, 12787 (2015).
  156. Hara, H. *et al.* The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection. *Cell* **175**, 1651–1664.e14 (2018).
  157. Sun, Y. *et al.* Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology* **144**, 1478–87, 1487.e1–8 (2013).
  158. Radulovic, K. *et al.* A dietary flavone confers communicable protection against colitis through NLRP6 signaling independently of inflammasome activation. *Mucosal Immunol.* **11**, 811–819 (2018).
  159. Hu, B. *et al.* Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9862–7 (2013).
  160. Seregin, S. S. *et al.* NLRP6 Protects IL-10<sup>-/-</sup> Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila*. *Cell Rep.* **19**, 733–745 (2017).
  161. Tytgat, K. M. A. J. *et al.* Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology* **107**, 1352–1363 (1994).

162. Velcich, A. *et al.* Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* **295**, 1726–9 (2002).
163. Birchenough, G. M. H., Nyström, E. E. L., Johansson, M. E. V & Hansson, G. C. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* **352**, 1535–42 (2016).
164. Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V. & Gordon, J. I. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* **4**, 269–273 (2003).
165. Salzman, N. H. *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* **11**, 76–82 (2010).
166. Huber, S. *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259–263 (2012).
167. Muñoz, M. *et al.* Interleukin-22 Induces Interleukin-18 Expression from Epithelial Cells during Intestinal Infection. *Immunity* **42**, 321–331 (2015).
168. Elinav, E., Thaiss, C. A. & Flavell, R. A. Analysis of Microbiota Alterations in Inflammasome-Deficient Mice. in 185–194 (Humana Press, Totowa, NJ, 2013). doi:10.1007/978-1-62703-523-1\_14
169. Henao-Mejia, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **482**, 179–185 (2012).
170. Lemire, P. *et al.* The NLR Protein NLRP6 Does Not Impact Gut Microbiota Composition. *Cell Rep.* **21**, 3653–3661 (2017).
171. Seregin, S. S. *et al.* NLRP6 function in inflammatory monocytes reduces susceptibility to chemically induced intestinal injury. *Mucosal Immunol.* **10**, 434–445 (2017).
172. Anand, P. K. *et al.* NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* **488**, 389–393 (2012).
173. Ghimire, L. *et al.* NLRP6 negatively regulates pulmonary host defense in Gram-positive bacterial infection through modulating neutrophil recruitment and function. *PLoS Pathog.* **14**, e1007308 (2018).
174. Ydens, E. *et al.* Nlrp6 promotes recovery after peripheral nerve injury independently of inflammasomes. *J. Neuroinflammation* **12**, 143 (2015).
175. Wang, P. *et al.* Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. *Science* **350**, 826–30 (2015).
176. Mehta, R. *et al.* Expression of NALPs in adipose and the fibrotic progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese subjects. *BMC Gastroenterol.* **14**, 208 (2014).
177. Liu, R. *et al.* Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components. *Oncotarget* **6**, 33456–69 (2015).
178. Nasi, M. *et al.* Analysis of inflammasomes and antiviral sensing components reveals decreased expression of NLRX1 in HIV-positive patients assuming efficient antiretroviral therapy. *AIDS* **29**, 1937–1941 (2015).
179. Gieger, C. *et al.* New gene functions in megakaryopoiesis and platelet formation. *Nature* **480**, 201–208 (2011).



180. Wan, F. & Lenardo, M. J. Specification of DNA Binding Activity of NF- $\kappa$ B Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a000067–a000067 (2009).
181. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
182. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49–62 (2007).
183. Basak, S. & Hoffmann, A. Crosstalk via the NF- $\kappa$ B signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 187–197 (2008).
184. Poveda, J. *et al.* TWEAK/Fn14 and Non-Canonical NF-kappaB Signaling in Kidney Disease. *Front. Immunol.* **4**, 447 (2013).
185. Moynagh, P. N. The NF- $\kappa$ B pathway. *J. Cell Sci.* **118**, 4589–4592 (2005).
186. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene* **25**, 6706–6716 (2006).
187. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- $\kappa$ B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621–663 (2000).
188. Senftleben, U. *et al.* Activation by IKK $\alpha$  of a Second, Evolutionary Conserved, NF-kappa B Signaling Pathway. *Science (80-. )*. **293**, 1495–1499 (2001).
189. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* **18**, 2195–2224 (2004).
190. Nelson, G. *et al.* Multi-parameter analysis of the kinetics of NF-kappaB signalling and transcription in single living cells. *J. Cell Sci.* **115**, 1137–48 (2002).
191. Karin, M. How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**, 6867–6874 (1999).
192. Scheidereit, C. I $\kappa$ B kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription. *Oncogene* **25**, 6685–6705 (2006).
193. Gilmore, T. D. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
194. Zhu, M. *et al.* L-cystathionine inhibits oxidized low density lipoprotein-induced THP-1-derived macrophage inflammatory cytokine monocyte chemoattractant protein-1 generation via the NF- $\kappa$ B pathway. *Sci. Rep.* **5**, 10453 (2015).
195. Sun, S.-C. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res.* **21**, 71–85 (2011).
196. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a000034 (2009).
197. Oitzinger, W. *et al.* Adenovirus-mediated expression of a mutant I $\kappa$ B kinase 2 inhibits the response of endothelial cells to inflammatory stimuli. *Blood* **97**, 1611–7 (2001).
198. Wan, F. *et al.* Ribosomal Protein S3: A KH Domain Subunit in NF- $\kappa$ B Complexes that Mediates Selective Gene Regulation. *Cell* **131**, 927–939 (2007).
199. Guijarro, C. & Egido, J. Transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and renal disease. *Kidney Int.* **59**, 415–424 (2001).

200. Shih, V. F.-S., Tsui, R., Caldwell, A. & Hoffmann, A. A single NF- $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* **21**, 86–102 (2011).
201. Hoesel, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86 (2013).
202. Moreno, J. A. *et al.* The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1315–25 (2011).
203. Dejardin, E. *et al.* The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525–35 (2002).
204. Dejardin, E. The alternative NF- $\kappa$ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1161–1179 (2006).
205. Hacker, H. & Karin, M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Sci. STKE* **2006**, re13-re13 (2006).
206. Naumann, M., Nieters, A., Hatada, E. N. & Scheidereit, C. NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors. *Oncogene* **8**, 2275–81 (1993).
207. Lin, H. *et al.* Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor- Protects Renal Tubular Cells from Doxorubicin-Induced Apoptosis. *Mol. Pharmacol.* **72**, 1238–1245 (2007).
208. Esteban, V. *et al.* Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1514–29 (2004).
209. Sanz, A. B. *et al.* TWEAK Activates the Non-Canonical NF- $\kappa$ B Pathway in Murine Renal Tubular Cells: Modulation of CCL21. *PLoS One* **5**, e8955 (2010).
210. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12481–6 (2006).
211. Ross, M. J., Martinka, S., D'Agati, V. D. & Bruggeman, L. A. NF-kappaB regulates Fas-mediated apoptosis in HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2403–11 (2005).
212. Sue, Y.-M. *et al.* Antioxidation and anti-inflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 769–777 (2008).
213. Meldrum, K. K. *et al.* Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappaB dependent mechanism. *J. Urol.* **168**, 248–52 (2002).
214. Ruiz-Ortega, M. *et al.* Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J. Immunol.* **161**, 430–9 (1998).
215. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Rupérez, M., Blanco, J. & Egido, J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am. J. Pathol.* **158**, 1743–56 (2001).
216. López-Franco, O. *et al.* Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* **161**, 1497–505 (2002).



217. Loverre, A. *et al.* Ischemia-Reperfusion Induces Glomerular and Tubular Activation of Proinflammatory and Antiapoptotic Pathways: Differential Modulation by Rapamycin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2675–2686 (2004).
218. Starkey, J. M. *et al.* Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. *Diabetes* **55**, 1252–9 (2006).
219. Mezzano, S. *et al.* NF-κB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 2505–2512 (2004).
220. Mezzano, S. A. *et al.* Tubular NF-κB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int.* **60**, 1366–1377 (2001).
221. Ashizawa, M. *et al.* Detection of nuclear factor-kappaB in IgA nephropathy using Southwestern histochemistry. *Am. J. Kidney Dis.* **42**, 76–86 (2003).
222. Sakai, N. *et al.* p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant* **17**, 998–1004 (2002).
223. Zheng, L., Sinniah, R. & I-Hong Hsu, S. In situ glomerular expression of activated NF-κB in human lupus nephritis and other non-proliferative proteinuric glomerulopathy. *Virchows Arch.* **448**, 172–183 (2006).
224. Lawrence, T. & Fong, C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF-κB. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 519–523 (2010).
225. Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R. & Willoughby, D. A. Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nat. Med.* **7**, 1291–1297 (2001).
226. Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Dröge, W. & Schmitz, M. L. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *J. Immunol.* **163**, 5617–23 (1999).
227. García-Piñeres, A. J. *et al.* Cysteine 38 in p65/ NF-κB Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *J. Biol. Chem.* **276**, 39713–39720 (2001).
228. Francescato, H. D. C., Costa, R. S., Scavone, C. & Coimbra, T. M. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology* **230**, 64–75 (2007).
229. Metz-Kurschel, U. *et al.* Folate nephropathy occurring during cytotoxic chemotherapy with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil. *Ren. Fail.* **12**, 93–7 (1990).
230. Zhang, B., Ramesh, G., Uematsu, S., Akira, S. & Reeves, W. B. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 923–32 (2008).
231. Ucerio, A. C. *et al.* TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes kidney fibrosis and Ras-dependent proliferation of cultured renal fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1744–55 (2013).
232. Haverty, T. P. *et al.* Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J. Cell Biol.* **107**, 1359–68 (1988).
233. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* 3,4-DGE is cytotoxic and decreases HSP27/HSPB1 in podocytes. *Arch. Toxicol.* **88**, 597–608 (2014).
234. Graña, O., Rubio-Camarillo, M., Fdez-Riverola, F., Pisano, D. G. & Glez-Peña, D.

- Nextpresso: Next Generation Sequencing Expression Analysis Pipeline. *Curr. Bioinform.* **13**, 583–591 (2018).
235. Babraham Bioinformatics FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. (Accessed: 24th December 2018)
  236. González-Guerrero, C. *et al.* CCL20 blockade increases the severity of nephrotoxic folic acid-induced acute kidney injury. *J. Pathol.* **246**, 191–204 (2018).
  237. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493–501 (1992).
  238. Kerrigan, D., Pommier, Y. & Kohn, K. W. Protein-linked DNA strand breaks produced by etoposide and teniposide in mouse L1210 and human VA-13 and HT-29 cell lines: relationship to cytotoxicity. *NCI Monogr.* 117–21 (1987).
  239. Anders, H.-J. & Schaefer, L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 1387–400 (2014).
  240. Sanchez-Nino, M. D., Sanz, A. B. & Ortiz, A. Uromodulin, Inflammasomes, and Pyroptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1761–1763 (2012).
  241. Bakker, P. J. *et al.* A tissue-specific role for Nlrp3 in tubular epithelial repair after renal ischemia/reperfusion. *Am. J. Pathol.* **184**, 2013–22 (2014).
  242. Bakker, P. J. *et al.* Nlrp3 is a key modulator of diet-induced nephropathy and renal cholesterol accumulation. *Kidney Int.* **85**, 1112–1122 (2014).
  243. Lorenz, G., Darisipudi, M. N. & Anders, H.-J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 41–48 (2014).
  244. Ludwig-Portugall, I. *et al.* An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates crystal-induced kidney fibrosis in mice. *Kidney Int.* **90**, 525–39 (2016).
  245. Wu, M. *et al.* NLRP3 deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in diabetic mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **478**, 115–125 (2018).
  246. Krishnan, S. M. *et al.* Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc. Res.* (2018). doi:10.1093/cvr/cvy252
  247. Gu, Y. *et al.* Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* **275**, 206–9 (1997).
  248. Ghayur, T. *et al.* Caspase-1 processes IFN- $\gamma$ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- $\gamma$  production. *Nature* **386**, 619–623 (1997).
  249. Leonard, M., Ryan, M. P., Watson, A. J., Schramek, H. & Healy, E. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells. *Kidney Int.* **56**, 1366–1377 (1999).
  250. Jo, S.-K., Cho, W. Y., Sung, S. A., Kim, H. K. & Won, N. H. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int.* **67**, 458–466 (2005).
  251. HAN, Y. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase-dependent interstitial macrophage

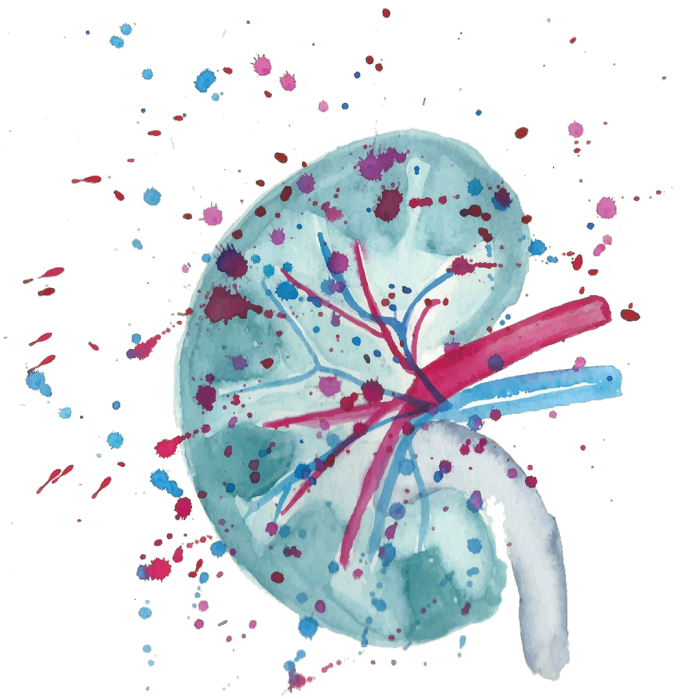
- proliferation in the obstructed mouse kidney. *Nephrology* **13**, 411–418 (2008).
252. Alderliesten, M. *et al.* Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation during Renal Ischemia/Reperfusion Mediates Focal Adhesion Dissolution and Renal Injury. *Am. J. Pathol.* **171**, 452–462 (2007).
  253. Korcheva, V., Wong, J., Corless, C., Iordanov, M. & Magun, B. Administration of Ricin Induces a Severe Inflammatory Response via Nonredundant Stimulation of ERK, JNK, and P38 MAPK and Provides a Mouse Model of Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Pathol.* **166**, 323–339 (2005).
  254. Stambe, C. *et al.* The role of p38alpha mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 370–9 (2004).
  255. Ma, F. Y., Tesch, G. H., Flavell, R. A., Davis, R. J. & Nikolic-Paterson, D. J. MKK3-p38 signaling promotes apoptosis and the early inflammatory response in the obstructed mouse kidney. *Am. J. Physiol. Physiol.* **293**, F1556–F1563 (2007).
  256. Ucero, A. C. *et al.* Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int. Urol. Nephrol.* **46**, 765–776 (2014).
  257. Keepers, T. R., Gross, L. K. & Obrig, T. G. Monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1 alpha, and RANTES recruit macrophages to the kidney in a mouse model of hemolytic-uremic syndrome. *Infect. Immun.* **75**, 1229–36 (2007).
  258. Liu, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **7**, 684–696 (2011).
  259. Böttinger, E. P. TGF- $\beta$  in Renal Injury and Disease. *Semin. Nephrol.* **27**, 309–320 (2007).
  260. Chevalier, R. L. Counterbalance in functional adaptation to ureteral obstruction during development. *Pediatr. Nephrol.* **4**, 442–4 (1990).
  261. Sugiyama, N., Kohno, M. & Yokoyama, T. Inhibition of the p38 MAPK pathway ameliorates renal fibrosis in an NPHP2 mouse model. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 1351–1358 (2012).
  262. Elinav, E., Henao-Mejia, J., Strowig, T. & Flavell, R. NLRP6 and Dysbiosis: Avoiding the Luring Attraction of Over-Simplification. *Immunity* **48**, 603–604 (2018).
  263. Mamantopoulos, M. *et al.* Nlrp6 and ASC-Dependent Inflammasomes Do Not Shape the Commensal Gut Microbiota Composition. *Immunity* **47**, 339–348.e4 (2017).
  264. Zhu, Y. *et al.* Effects of NLRP6 on the proliferation and activation of human hepatic stellate cells. *Exp. Cell Res.* **370**, 383–388 (2018).
  265. Mosallanejad, K. *et al.* The DEAH-Box RNA Helicase DHX15 Activates NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Downstream of MAVS During Antiviral Responses. *Sci. Signal.* **7**, ra40-ra40 (2014).
  266. Pan, L. *et al.* DHX15 is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia (AML) and regulates cell apoptosis via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oncotarget* **8**, 89643–89654 (2017).
  267. Tissue expression of DHX15 Staining in kidney. The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109606-DHX15/tissue/kidney#>. (Accessed: 5<sup>th</sup> February 2019)

268. Poveda, J. *et al.* Bcl3: a regulator of NF- $\kappa$ B inducible by TWEAK in acute kidney injury with anti-inflammatory and antiapoptotic properties in tubular cells. *Exp. Mol. Med.* **49**, e352 (2017).
269. Sanz, A. B. *et al.* TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, i54–i62 (2014).
270. Ruiz-Andres, O. *et al.* The inflammatory cytokine TWEAK decreases PGC-1 $\alpha$  expression and mitochondrial function in acute kidney injury. *Kidney Int.* **89**, 399–410 (2016).
271. Qazi, O., Parthasarathy, P. T., Lockey, R. & Kolliputi, N. Can microRNAs keep inflammasomes in check? *Front. Genet.* **4**, 30 (2013).
272. Kracht, M. *et al.* Anti-inflammatory MicroRNAs and Their Potential for inflammatory Diseases Treatment. **9**, 1 (2018).
273. Wu, H. *et al.* IL-18 contributes to renal damage after ischemia-reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 2331–41 (2008).
274. Anand, P. K. & Kanneganti, T.-D. NLRP6 in infection and inflammation. *Microbes Infect.* **15**, 661–8 (2013).
275. Badid, C. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**, 1993–1998 (2002).
276. Ai, J. *et al.* GQ5 Hinders Renal Fibrosis in Obstructive Nephropathy by Selectively Inhibiting TGF- $\beta$ -Induced Smad3 Phosphorylation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1827–38 (2015).
277. Meng, X.-M., Tang, P. M.-K., Li, J. & Lan, H. Y. TGF- $\beta$ /Smad signaling in renal fibrosis. *Front. Physiol.* **6**, 82 (2015).
278. Anders, H.-J. & Muruve, D. A. The Inflammasomes in Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1007–1018 (2011).
279. Khalil, H. *et al.* Fibroblast-specific TGF- $\beta$ –Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 3770–3783 (2017).
280. Reeves, H. L. & Friedman, S. L. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front. Biosci.* **7**, d808-26 (2002).
281. Tissue expression of PPM1A - Summary - The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000100614-PPM1A/tissue>. (Accessed: 8th February 2019)
282. Takekawa, M., Maeda, T. & Saito, H. Protein phosphatase 2C $\alpha$  inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.* **17**, 4744–4752 (1998).
283. Lu, X. *et al.* PPM1A is a RelA phosphatase with tumor suppressor-like activity. *Oncogene* **33**, 2918–27 (2014).
284. Ramezani, A. *et al.* Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am. J. Kidney Dis.* **67**, 483–98 (2016).
285. Mafra, D. & Fouque, D. Gut microbiota and inflammation in chronic kidney disease patients. *Clin. Kidney J.* **8**, 332–4 (2015).
286. Rabb, H., Pluznick, J. & Noel, S. The Microbiome and Acute Kidney Injury. *Nephron* **140**, 120–123 (2018).

287. Al Khodor, S. & Shatat, I. F. Gut microbiome and kidney disease: a bidirectional relationship. *Pediatr. Nephrol.* **32**, 921–931 (2017).
288. Lehto, M. & Groop, P.-H. The Gut-Kidney Axis: Putative Interconnections Between Gastrointestinal and Renal Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 553 (2018).
289. De Angelis, M. *et al.* Microbiota and Metabolome Associated with Immunoglobulin A Nephropathy (IgAN). *PLoS One* **9**, e99006 (2014).
290. Sirich, T. L., Plummer, N. S., Gardner, C. D., Hostetter, T. H. & Meyer, T. W. Effect of Increasing Dietary Fiber on Plasma Levels of Colon-Derived Solutes in Hemodialysis Patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1603–1610 (2014).
291. Aronov, P. A. *et al.* Colonic Contribution to Uremic Solutes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1769–1776 (2011).
292. Yan, J. *et al.* Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E7554–E7563 (2016).
293. Hatch, M. & Vaziri, N. D. Enhanced enteric excretion of urate in rats with chronic renal failure. *Clin. Sci. (Lond)*. **86**, 511–6 (1994).
294. Koppe, L., Mafra, D. & Fouque, D. Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int.* **88**, 958–966 (2015).
295. Choi, H. H. & Cho, Y.-S. Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin. Endosc.* **49**, 257–65 (2016).
296. Ritz, E. Intestinal-Renal Syndrome: Mirage or Reality? *Blood Purif.* **31**, 70–76 (2011).
297. Vaziri, N. D., Yuan, J. & Norris, K. Role of Urea in Intestinal Barrier Dysfunction and Disruption of Epithelial Tight Junction in Chronic Kidney Disease. *Am. J. Nephrol.* **37**, 1–6 (2013).
298. Magnusson, M., Magnusson, K.-E., Sundqvist, T. & Denneberg, T. Increased Intestinal Permeability to Differently Sized Polyethylene Glycols in Uremic Rats: Effects of Low- and High-Protein Diets. *Nephron* **56**, 306–311 (1990).
299. Magnusson, M., Magnusson, K. E., Sundqvist, T. & Denneberg, T. Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut* **32**, 754–9 (1991).
300. de Almeida Duarte, J. B., de Aguilar-Nascimento, J. E., Nascimento, M. & Nochi, R. J. Bacterial translocation in experimental uremia. *Urol. Res.* **32**, 266–70 (2004).
301. Vaziri, N. D., Dure-Smith, B., Miller, R. & Mirahmadi, M. K. Pathology of gastrointestinal tract in chronic hemodialysis patients: an autopsy study of 78 cases. *Am. J. Gastroenterol.* **80**, 608–11 (1985).
302. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 799–809 (2009).
303. Ma, T. Y., Nighot, P. & Al-Sadi, R. Tight Junctions and the Intestinal Barrier. in *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 587–639 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809954-4.00025-6
304. Nusrat, A., Turner, J. R. & Madara, J. L. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **279**, G851–G857 (2000).

305. Al-Sadi, R., Boivin, M. & Ma, T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front. Biosci. (Landmark Ed.* **14**, 2765–78 (2009).
306. BRUEWER, M., SAMARIN, S. & NUSRAT, A. Inflammatory Bowel Disease and the Apical Junctional Complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1072**, 242–252 (2006).
307. Shen, L. & Turner, J. R. Role of Epithelial Cells in Initiation and Propagation of Intestinal Inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **290**, G577–G582 (2006).

# Anexos



*“El que ha llegado tan lejos que ya no se confunde, ha dejado también de trabajar”*

*MAX PLANCK*



## ANEXOS

### Publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis

**Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Nuñez G, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Loss of NLRP6 expression increases the severity of Acute Kidney Injury. Nephrol Dial Transplant. 2019 **(En revisión)**.

**Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Nuñez G, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Loss of NLRP6 expression increases the severity of Kidney fibrosis **(En preparación)**.

### Congresos o reuniones científicas nacionales o internacionales en los que he presentado resultados de esta tesis

**Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Nuñez G, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Loss of NLRP6 expression increases the severity of Acute Kidney Injury. 56<sup>th</sup> ERA-EDTA Congress. Budapest, June 13-16, 2019. Poster.

**Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Nuñez G, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Loss of NLRP6 expression increases the severity of Acute Kidney Injury. 1st PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine. Madrid, May 18, 2018 **(premio mejor comunicación oral)**.

### Otras publicaciones durante esta tesis

1: **Valiño-Rivas L**, Vaquero JJ, Sucunza D, Gutierrez S, Sanz AB, Fresno M, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. NIK as a druggable mediator of tissue injury. Trends in Molecular Medicine. 2019 Mar 26. doi:10.1016/j.molmed.2019.02.005. PubMed PMID: 30926358

2: **Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Agustin M, Husi H, Cannata-Ortiz P, Sanz AB, Mischak H, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. MAGE genes in the kidney: identification of MAGED2 as upregulated during kidney injury and in stressed tubular cells. Nephrol Dial Transplant. 2018 Dec 11. doi: 10.1093/ndt/gfy367. PubMed PMID: 30541139.

3: **Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Grana O, Bucala R, Leng L, Sanz A, Gomez G, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. TWEAK increases CD74 expression and sensitizes to DDT proinflammatory actions in tubular cells. PLoS One. 2018 Jun 20;13(6):e0199391. doi: 10.1371/journal.pone.0199391. eCollection 2018. PubMed PMID: 29924850; PubMed Central PMCID: PMC6010292.

4: **Valiño-Rivas L**, Gonzalez-Lafuente L, Sanz AB, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Non-canonical NF-κB activation promotes chemokine expression in podocytes. Sci



Rep. 2016 Jun 29;6:28857. doi: 10.1038/srep28857. PubMed PMID: 27353019; PubMed Central PMCID: PMC4926283.

5: **Valiño-Rivas L**, Baeza-Bermejillo C, Gonzalez-Lafuente L, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. CD74 in Kidney Disease. Front Immunol. 2015 Sep 23;6:483. doi: 10.3389/fimmu.2015.00483. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26441987; PubMed Central PMCID: PMC4585214.

6: Sanchez-Niño MD, Perez-Gomez MV, **Valiño-Rivas L**, Torra R, Ortiz A. Podocyturia: why it may have added value in rare diseases. Clin Kidney J. 2018 Oct 5;12(1):49-52. doi: 10.1093/ckj/sfy081. eCollection 2019 Feb. PubMed PMID: 30863545; PubMed Central PMCID: PMC6407136.

7: Fontecha-Barriuso M, Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Sanchez-Niño MD, **Valiño-Rivas L**, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Sanz AB. Targeting epigenetic DNA and histone modifications to treat kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2018 Nov 1;33(11):1875-1886. doi: 10.1093/ndt/gfy009. PubMed PMID: 29534238.

8: Fernandez-Fernandez B, Izquierdo MC, **Valiño-Rivas L**, Nastou D, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Albumin downregulates Klotho in tubular cells. Nephrol Dial Transplant. 2018 Oct 1;33(10):1712-1722. doi: 10.1093/ndt/gfx376. PubMed PMID: 29425318.

9: Sanchez-Niño MD, Zheng-Lin B, **Valiño-Rivas L**, Sanz AB, Ramos AM, Luño J, Goicoechea M, Ortiz A. Lesinurad: what the nephrologist should know. Clin Kidney J. 2017 Oct;10(5):679-687. doi: 10.1093/ckj/sfx036. Epub 2017 May 26. PubMed PMID: 28979780; PubMed Central PMCID: PMC5622894.

10: Trimarchi H, Canzonieri R, Schiel A, Politei J, Costales-Collaguazo C, Stern A, Paulero M, Rengel T, **Valiño-Rivas L**, Forrester M, Lombi F, Pomeranz V, Iriarte R, Murryan A, Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Zotta E. Expression of uPAR in Urinary Podocytes of Patients with Fabry Disease. Int J Nephrol. 2017;2017:1287289. doi: 10.1155/2017/1287289. Epub 2017 Apr 24. PubMed PMID: 28523190; PubMed Central PMCID: PMC5420917.

11: Ortiz A, Husi H, Gonzalez-Lafuente L, **Valiño-Rivas L**, Fresno M, Sanz AB, Mullen W, Albalat A, Mezzano S, Vlahou T, Mischak H, Sanchez-Niño MD. Mitogen-Activated Protein Kinase 14 Promotes AKI. J Am Soc Nephrol. 2017 Mar;28(3):823-836. doi: 10.1681/ASN.2015080898. Epub 2016 Sep 12. PubMed PMID: 27620989; PubMed Central PMCID: PMC5328147.

## Otros congresos o reuniones científicas

1: Sanchez-Niño MD, **Valiño-Rivas L**, Cuarental L, Ortiz A. Ratón Súper-Fabry: identificación de nuevos mediadores de daño tisular. X Congreso Internacional de Medicamentos Huérfanos y Enfermedades Raras. Sevilla, Febrero 23-25, 2019. Poster.

2: **Valiño-Rivas L**, Grana O, Bucala R, Leng L, Sanz AB, Gomez G, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. TWEAK increases CD74 expression and sensitizes to DDT proinflammatory actions in tubular cells. American Society of Nephrology Kidney Week. Nueva Orleans, October 31- November 05, 2017. Poster.

3: Fernandez-Fernandez B, Izquierdo MC, Nastou D, **Valiño-Rivas L**, Gonzalez- Lafuente L, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Albumin downregulates Klotho in tubular cells. 53rd ERA-EDTA Congress. Madrid, June 3-6, 2017. Poster

4: Sanchez-Niño MD, **Valiño-Rivas L**, Gonzalez-Lafuente L, Husi H, Fresno M, Sanz AB, Mezzano S, Vlahou T, Mischak H, Ortiz A. MAP3K14 promotes acute kidney injury. 53rd ERA-EDTA Congress. Vienna, May 21-24, 2016. Poster.